

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ASSOCIADO EM
EDUCAÇÃO FÍSICA – UEM/UEL

CAROLINE DE CARVALHO PICOLI

**INFLUÊNCIA DOS TREINAMENTOS
AERÓBIO, RESISTIDO E
CONCORRENTE SOBRE O
BROWNING DO TECIDO ADIPOSEO
BRANCO**

Maringá
2016

CAROLINE DE CARVALHO PICOLI

**INFLUÊNCIA DOS TREINAMENTOS
AERÓBIO, RESISTIDO E CONCORRENTE
SOBRE O *BROWNING* DO TECIDO
ADIPOSO BRANCO**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação
Associado em Educação Física -
UEM/UEL, para obtenção do título de
Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres

Maringá
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P598i Picoli, Caroline de Carvalho
Influência dos treinamentos aeróbio, resistido e
concorrente sobre o browning do tecido adiposo
branco/ Caroline de Carvalho Picoli. -- Maringá,
2016.
71 f. : il. color., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento
de Educação Física, Programa de Pós-Graduação em
Educação Física - UEM/UEL, 2016.

1. Fisiologia do exercício. 2. Tecido adiposo. 3.
Treinamento aeróbio. 4. Treinamento resistido. 5.
Treinamento concorrente. 6. Browning. I. Peres,
Sidney Barnabé, orient. II. Universidade Estadual de
Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento
de Educação Física. Programa de Pós-Graduação em
Educação Física - UEM/UEL. III. Título.

CDD 22. ED.796.077
JLM000698

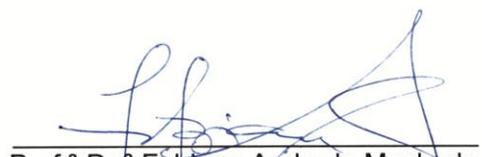
CAROLINE DE CARVALHO PICOLI

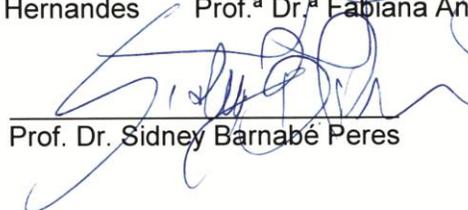
**INFLUÊNCIA DOS TREINAMENTOS
AERÓBIO, RESISTIDO E CONCORRENTE
SOBRE O *BROWNING* DO TECIDO
ADIPOSO BRANCO**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação
Associado em Educação Física –
UEM/UEL, para obtenção do título de
Mestre em Educação Física.

Aprovada em 28 de Abril de 2016.


Prof.^a Dr.^a Luzmarina Hernandez


Prof.^a Dr.^a Fabiana Andrade Machado


Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres

Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus pais e a minha família que me deram suporte e força durante esses anos de mestrado para que eu pudesse estudar e concluir esse trabalho

Ao meu orientador Sidney Barnabé Peres por sempre me dar apoio científico, me ajudando a crescer academicamente e por sempre estar disposto a ajudar e ensinar e, portanto, contribuir diretamente com meu conhecimento e principalmente com a produção desse trabalho. Obrigada também por ser um amigo, dentro e fora, da faculdade.

Ao meu amigo Gustavo Gilio, irmão acadêmico, que esteve comigo dia após dia trabalhando duro nos experimentos para que tudo desse certo.

Ao meu namorado Lucas F. Rodrigues por estar ao meu lado, por me dar apoio e força em cada momento, e me impulsionar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

As técnicas do laboratório de fisiologia e de histologia (Valeria, Elizete, Márcia, Eurídes, Maria Angela e Dos Anjos) que sempre me ajudaram em todos os experimentos, nas técnicas de laboratório e assim, acrescentaram mais conhecimento na minha trajetória e alegria aos dias extensos de rotina.

Ao Prof. Paulo Mathias e Laize Peron por ceder espaço em seu laboratório para o uso de equipamentos.

Ao pessoal do laboratório da Universidade de Mogi das Cruzes, que nos ajudaram a realizar técnicas essenciais para a construção desse trabalho, Felipe Henrique, Kaltinaitis, Luana Leal, Felipe Franco, Juliana Vieira e Prof. Miguel Luiz Batista Junior.

Aos amigos que nos ajudaram com o andamento do protocolo experimental: Guilherme Pitão, Lucas Jacob, Erik Raul e Victor Augusto Roncaglia.

Aos amigos que foram indispensáveis durante esses anos de estudos, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e/ou fizeram parte da minha vida durante o mestrado: Eloa Jacques, Daysa, Luciana, Debora Guariglia, Rafael

Evangelista, Giselle Bueno, Paulo Romeiro, Kátia Sabin, Jean Beson, Cecilia Peserico, Prof.^a Maria Montserrat, Prof.^a Solange, Prof^a Rosangela Melo e Prof. Ademir.

As professores Luzmarina Hernandes e Fabiana Machado por aceitarem meu convite em compor a banca desse trabalho e por me ajudarem deixa-lo melhor.

Ao Programa de Pós-graduação em Educação Física UEM/UEL e a CAPES/Fundação Araucária por proporcionar a realização desse trabalho.

PICOLI, Caroline de Carvalho. **Influência dos treinamentos aeróbio, resistido e concorrente sobre o *browning* do tecido adiposo branco**. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, 2016.

RESUMO

As células adiposas brancas são especializadas em armazenar lipídeos, sem que isso seja prejudicial a sua integridade funcional, enquanto que somente as células marrons possuem uma capacidade adicional de dissipar energia na forma de calor através da ação da proteína desacopladora 1 (UCP1) localizada dentro da membrana interna da mitocôndria (JONG et al., 2015). Posteriormente, surgiram várias evidências da existência de células que naturalmente expressavam UCP1, mas apresentavam fenótipo intermediário entre células brancas e marrons, sendo assim chamadas de adipócitos beges (WU et al., 2012). Esse fenótipo intermediário foi denominado de *browning* devido a transdiferenciação dos adipócitos brancos, no qual assumiram características de adipócitos marrons, onde dados recentes sugerem que esta expressão aumenta após o treinamento aeróbio (BOSTRÖM et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe como o exercício físico e seus diferentes tipos contribuem na modulação da expressão de UCP1 em células originalmente brancas ou beges. Por isso, o objetivo desse estudo foi analisar a influência dos treinamentos físicos aeróbio, resistido e concorrente sobre o *browning* do tecido adiposo branco, subcutâneo (inguinal) e visceral (retroperitoneal). Para tal, foram utilizados 120 camundongos da linhagem Swiss, machos, com 35 dias de vida, que realizaram o treinamento aeróbio, resistido e concorrente, 5 vezes por semana, ao longo de 8 semanas. Após o protocolo de treinamento, foi realizado a eutanásia dos animais para a coleta dos depósitos adiposos inguinal e retroperitoneal que foram pesados e analisados por meio de técnicas de imunohistoquímica para análise da expressão proteica de UCP1 e qPCR para quantificação dos RNA mensageiros da UCP1, CD137, TMEM26 e EVA1. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste de ANOVA *One-Way*, com *post hoc* de *Tukey* foi utilizado quando assumida a homogeneidade dos dados e o teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado quando negada a semelhança. A significância adotada foi de $P < 0,05$. Houve aumento da expressão proteica de UCP1 no tecido adiposo inguinal no grupo treinamento aeróbio de 150,7% no tecido subcutâneo e de 250% no tecido visceral, ambos em relação ao grupo sedentário ($p < 0,05$). O treinamento resistido induziu aumento significativo na expressão proteica de UCP1 em ambos os tecidos adiposos, com cerca de 152% para o subcutâneo e 263% para o depósito visceral, em relação aos animais sedentários ($p < 0,05$). Por fim, a expressão gênica de CD137 no tecido adiposo subcutâneo, marcador fenotípico de células bege, aumentou 730,29% no grupo aeróbio, 294,37% no resistido e 1.878,23% no grupo concorrente. Já para a região visceral houve aumento de 339,25% para o grupo aeróbio, 557,61% para o grupo resistido e 54,59% para o grupo concorrente, todos comparados com o grupo sedentário. Portanto, a expressão de UCP1 pareceu-nos tecido dependente, sendo mais responsiva ao treinamento resistido. O aumento da expressão gênica de CD137 nos grupos treinados sugere maior presença de células beges dentro do tecido adiposo branco.

Palavras-chave: tecido adiposo bege, treinamento, UCP1

PICOLI, Caroline de Carvalho. **Influence of aerobic training, resistance and concurrent on the browning of white adipose tissue.** Dissertation (Masters in Physical Education) - Health Sciences Center State University of Maringa, Maringa-PR, 2016

ABSTRACT

White fat cells are specialized in storing lipids, without this being detrimental to their functional integrity, while only the brown cells have an additional ability to dissipate energy as heat through the action of uncoupling protein 1 (UCP1) located within the inner mitochondrial membrane (JONG et al., 2015). Subsequently, there were several evidence for cells that naturally express UCP1, but had intermediate phenotype between white and brown cells, so called beige adipocytes (Wu et al., 2012). This intermediate phenotype was called browning due to transdifferentiation of white adipocytes, which took the brown adipocytes characteristics, where recent data suggest that this expression increases after aerobic training (BOSTRÖM et al., 2013). However, little is known as exercise and its various types contribute to the modulation of UCP1 expression in originally white or beige cells. Therefore, the aim of this study was to analyze the influence of aerobic physical training, weathered and competitor on the browning of white adipose tissue, subcutaneous (inguinal) and visceral (retroperitoneal). For this, we used 120 mice of the Swiss strain, male, with 35 days of life, who performed aerobic, resistance training and concurrent, 5 times a week over 8 weeks. After the training protocol, euthanasia of the animals was performed to collect the inguinal and retroperitoneal adipose deposits were weighed and analyzed by immunohistochemical techniques for the analysis of protein expression of UCP1 and qPCR for quantification of RNA messengers of UCP1, CD137, TMEM26 and EVA1. The normality of the data was verified by the Shapiro-Wilk test. The test one-way ANOVA with Tukey post hoc was used when the assumed homogeneity of the data and the Kruskal-Wallis test was used when denied the resemblance. The significance adopted was $P < 0.05$. An increase of the protein expression of UCP1 in inguinal adipose tissue in aerobic training group of 150.7% in the subcutaneous tissue and visceral tissue to 250%, both compared to sedentary group ($p < 0.05$). The resistance training induced a significant increase in the expression of UCP1 protein in both adipose tissue, with about 152% to 263% for subcutaneous and visceral deposit, compared to sedentary animals ($p < 0.05$). Finally, the CD137 gene expression in subcutaneous adipose tissue, phenotypic marker beige cells, increased 730.29% in the group aerobic, 294.37% 1878.23% in resistance and the concurrent group. As for the visceral region increased by 339.25% for aerobic group, 557.61% for the resistance group and 54.59% for the concurrent group, all compared to the sedentary group. Therefore, the expression of UCP1 seemed to us dependent tissue, and more responsive to resistance training. Increased gene expression of CD137 in the trained groups suggests greater presence of beige cells in the white adipose tissue.

Keywords: beige fat, training, UCP1 Keywords: beige adipocyte, exercise, UCP1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Consumo alimentar, peso corporal inicial, peso corporal final e a variação do peso corporal (delta) apresentados pelos diferentes grupos experimentais exercitados ou não. Valores expressos em média e desvio padrão.....	45
Tabela 2 - Peso (g) dos tecidos adiposos inguinal (ING) e retroperitoneal (RET) e dos grupos treinados e sedentário.....	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sítios de captação de FDG correspondentes a depósitos de tecido adiposo marrom em humanos adultos. As áreas em preto são aquelas mais frequentemente descritos, as zonas cinzentas nem sempre são encontrados (Modificado de NEDERGAARD;BENGTSSON; CANNON, 2007)..... 22
- Figura 2. Origem das células adiposas. Existem pelo menos três precursores que dão origem a células adiposas brancas, bege e marrom separadamente. Os precursores de adipócitos marrons expressam Pax7 e Myf5+. Adipócitos brancos e de cor bege vem de duas populações distintas de precursores de linhagens Pax7 e Myf5- (Modificado de WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013)..... 25
- Figura 3. Esquema representando o efeito da Irisina sobre o tecido adiposo branco. A irisina é liberada no músculo esquelético, principalmente após exercícios físicos, desencadeando a diferenciação de células precursoras, presentes do tecido adiposo branco, em células com características de adipócitos marrons com alta abundância de UCP- 1, gotículas multiloculares de gordura e mitocôndrias (VILLARROYA, 2012)..... 29
- Figura 4. Esquema representativo do desenho experimental..... 37
- Figura 5. (A) Velocidade máxima alcançada durante o teste incremental; (V_{pico}) em cm/s (B) Teste de carga máxima levantada (g) dos grupos SED= sedentário; e grupos do treinamento AER= aeróbio; RES= resistido; CON= concorrente. Valores expressos em média \pm desvio padrão. α $p < 0,05$ em relação a diferença entre os momentos (pré e pós); $\$p < 0,05$ em relação a SED no pós teste; $\epsilon p < 0,05$ em relação diferenteça do grupo CON no pós teste e $\dagger p < 0,05$ em relação diferença com o grupos RES no pré teste. (n=30 animais/grupo)..... 44
- Figura 6– (A) Fotomicrografia da área lipídica ocupada (μm^2) no tecido adiposo marrom (n=5) onde foi realizado a histoquímica através da técnica de H,E, com cortes semi-seriados de $5\mu m$ e a captura das imagens foram realizadas com objetiva de 40X e ocular de 10x, resultando numa ampliação de 400x. (B) peso do depósito de adiposo marrom (n=10). (C) área lipídica ocupada (μm^2) (n=5), dos grupos experimentais SED = sedentário, AER= treinamento aeróbio, RES= treinamento resistido e CON= treinamento concorrente. Valores expressos em média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SED..... 46

Figura 7. (A) Nível de expressão de RNAm de UCP1 nos depósitos de gordura ING e RET obtidos pela técnica de qPCR; (B) Tamanho do efeito da expressão de RNAm de UCP1, obtidos pela técnica de qPCR, em relação ao grupo sedentário nos depósitos de gordura ING e RET. SED= sedentários, AER= aeróbios, RES= resistidos e CON = concorrente; ING= inguinal e RET= retroperitoneal. Valores expressos em média \pm desvio padrão, (n=5 animais/grupo)..... 48

Figura 8. (A) Fotomicrografia da imunohistoquímica de UCP1;(B) Área ocupada (μm^2) de UCP1; (C) Tamanho do efeito da área ocupada (μm^2) de UCP1 em relação ao grupo SED; nos diferentes grupos experimentais: SED= sedentários, AER= aeróbios, RES= resistidos e CON = concorrente. ING=inguina e RET=retroperitoenal. Valores expressos em média \pm desvio padrão, * $p<0,05$ em relação ao grupo SED; # $p<0,05$ em relação ao grupo AER. Tamanho de efeito, sendo considerada pequena quando $\leq 0,2$, media quando $\leq 0,5$ e grande quando $< 0,8$. (n=5 animais/grupo)..... 50

Figura 9 – (A) Níveis de expressão de RNAm de TMEM26, CD137 e EVA1 no tecido adiposo inguinal; (B) Tamanho de efeito de RNAm de TMEM26, CD137 e EVA1 no tecido adiposo inguinal; (C) Níveis de expressão de RNAm de TMEM26, CD137 e EVA1 no tecido adiposo retroperitoneal; (D) Tamanho de efeito de RNAm de TMEM26, CD137 e EVA1 no tecido adiposo inguinal; de camundongos de grupos SED= sedentários, AER= aeróbios, RES= resistidos e CON = concorrente. Valores expressos em média \pm desvio padrão, $^{\Omega}$ $p<0,05$ em relação ao grupo RES. Tamanho de efeito, sendo considerada pequena quando $\leq 0,2$, media quando $\leq 0,5$ e grande quando $< 0,8$. n=5 por grupo. (n=5 animais/grupo)..... 53

Figura 10. (A) Fotomicrografia da técnica de imunohistoquímica de VEGF no tecido adiposo inguinal, com cortes semi-seriados de 5 μm . A captura das imagens foi realizada com objetiva de 40x e ocular de 10x, resultado numa ampliação de 400x. (B) Área ocupada por VEGF no tecido adiposo inguinal; (C) Tamanho do efeito da área ocupada por VEGF no tecido adiposo inguinal. SED = sedentário, AER= treinamento aeróbio, RES= treinamento resistido e CON= treinamento concorrente. Valores expressos em média \pm desvio padrão, * $p<0,05$ em relação ao grupo SED. (n=5 animais/grupo)..... 55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AER	Animais do treinamento aeróbio
Asc1	<i>guanine nucleotide-binding protein subunit beta</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
CD137	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9</i>
Cidea	<i>cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A</i>
CON	Animais do treinamento concorrente
EVA1	Enhancer of ventral-axon guidance defects of unc-40 mutants
FDG	Fluordesoxiglicose – 18
FNDC5	Fibronectina de tipo III com domínio 5
ING	Tecido adiposo inguinal
Myf5	Fator miogênico 5
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
PGC1α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator</i>
PPARγ	Proteína proliferadora de peroxissomas
Pax7	<i>paired box 7</i>
PRDM16	Domínio PR contendo 16
RES	Animais do treinamento resistido
RET	Tecido adiposo retroperitoneal
SED	Animais sedentário
Tbx1	<i>T-box proteína 1</i>
Tcf21	fator de transcrição 21
TMEM26	proteína transmembrana 26
UCP1	Proteína desacopladora-1
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor precursor</i>
VO_{2máx}	Consumo máximo de oxigênio
V_{pico}	Velocidade pico (de corrida)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. TIPOS DE TECIDO ADIPOSEO	17
3.1.1. O tecido adiposo branco.....	17
3.1.2. O tecido adiposo marrom.....	20
3.1.3. O tecido adiposo bege.....	23
3.1.4. Alterações na plasticidade do tecido adiposo associado ao exercício físico.....	25
3.2. TIPOS DE EXERCÍCIO FÍSICO	29
3.2.1. Exercício aeróbio.....	29
3.2.2. Exercício resistido.....	31
3.2.3. Exercício concorrente.....	33
4. MÉTODOS	35
4.1. Animais.....	35
4.2. Protocolos de treinamento.....	35
4.2.1. Treinamento físico aeróbio.....	36
4.2.1.1. Determinação da velocidade pico.....	37
4.2.2. Treinamento físico resistido.....	37
4.2.2.1. Determinação da carga máxima levantada.....	38
4.2.3. Treinamento físico concorrente.....	38
4.3. Procedimentos Experimentais.....	39
4.4. Análises morfométricas.....	39
4.4.1. Tecido Adiposo Marrom.....	39
4.4.2. Imunohistoquímica.....	39
4.5. Quantificação de RNA mensageiro (RNAm) por qPCR.....	40
4.6. Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS	42
5.1. Velocidade Pico e Carga máxima.....	43
5.2. Parâmetros gerais.....	44
5.3. Imunohistoquímica e qPCR.....	46
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS	61
ANEXO I – Parecer do comitê de ética	71

1 INTRODUÇÃO

O tecido adiposo apresenta em sua estrutura a presença de diferentes tipos de células adiposas, definidas de acordo com a sua morfologia, origem embrionária e expressão de genes característicos que definem seu fenótipo. Esses tipos celulares são classificados em adipócitos brancos, marrons e bege (WU et al., 2012). Todos os tipos de adipócitos são especializados em armazenar lipídeos sem que isso seja prejudicial a sua integridade funcional, sendo fundamentais para a regulação do balanço energético de diversas espécies (KLAUS, 2001). Todavia, somente as células marrons e bege possuem uma capacidade adicional de dissipar energia na forma de calor através da ação da proteína desacopladora 1 (UCP1) que está localizada dentro da membrana interna da mitocôndria (JONG et al., 2015). Para os tecidos adiposos branco e marrom existe uma localização anatômica definida, sendo encontrados em depósitos subcutâneos e viscerais (CINTI, 2009), e em depósitos discretos e difusos (RAVUSSIN, GALGANI, 2011), respectivamente. Já para o tecido adiposo bege não existe uma localização específica, ele está em coexistência com o tecido branco (JONG et al., 2015).

Sabe-se que mamíferos de pequeno porte, como roedores e neonatos, possuem depósitos de tecido marrom bem definidos. A presença de tecido adiposo marrom, ao contrário do que se acreditava, se mantém na vida adulta. A análise criteriosa de imagens obtidas em tomografias de emissão de pósitrons, usando-se 18-fluordesoxiglicose como contraste combinada à tomografia computadorizada (PET-SCAN) (RICHARD et al., 2012; CYPESS et al., 2009; NEDERGAARD, BENGTSSON, CANNON, 2007) possibilitou a localização de sítios precisos de tecido adiposo marrom em humanos adultos. Após a identificação de tecido adiposo marrom em seres humanos, outros pesquisadores interessados na possibilidade de encontrar um viés terapêutico para doenças metabólicas através do aumento do gasto energético (WU, COHEN, SPIEGELMAN, 2013), identificaram a presença de UCP1 no tecido adiposo branco cervical de humanos (ZINGARETTI et al., 2009), no tecido adiposo branco

subcutâneo (JONG et al., 2015; WU et al., 2012) e no tecido adiposo visceral (BOSTRÖM et al., 2012) de animais.

A expressão de UCP1, dentro do tecido adiposo branco, foi denominada de *browning*, devido a uma transdiferenciação dos adipócitos brancos, no qual passaram a assumir características de adipócitos marrons (BOSTRÖM et al., 2012). Além do mais, a expressão dessa proteína também parece estar relacionada com a expressão de outras proteínas como a *vascular endothelial growth factor precursor* (VEGF) e *peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator* (PCG1-α), classificadas como expressões anteriores ao da UCP1, permitindo um aumento da vascularização atrelado a biogênese mitocondrial (SUN et al., 2012).

Posteriormente, surgiram várias evidências da existência de células originalmente brancas, já que alguns estudos verificaram a presença de genes específicos para cada tipo de tecido adiposo como, por exemplo: *T-box proteína 1* (Tbx1), *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9* (CD137) e proteína transmembrana 26 (TMEM26) foram definidas para adipócitos brancos (LIDELL, BETZ, ENERBACK, 2013; WU et al., 2012), enquanto que para adipócitos marrons os genes mais específicos são: *cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A* (Cidea), PCG1-α (WU et al., 2013) e *Enhancer of ventral-axon guidance defects of unc-40 mutants* (EVA1) e para adipócitos brancos são: *guanine nucleotide-binding protein subunit beta* (Asc1) e fator de transcrição 21 (Tcf21) para o depósito visceral (JONG et al., 2015).

Dentro desse contexto, o exercício físico aeróbio parece estimular, por influência beta adrenérgica, o processo de transdiferenciação no tecido adiposo branco, passando a ser potencialmente visto como um estímulo fisiológico eficiente no combate da obesidade e de doenças relacionadas a ela por aumentar o gasto energético (MATTEIS et al., 2013; BOSTRÖM et al., 2012). Entretanto, ainda existe uma lacuna a respeito da influência de outros tipos de exercício físico. Dessa forma, este estudo teve como objetivo principal analisar se os efeitos dos treinamentos aeróbios, resistido ou concorrente estimulam o “*browning*” do tecido adiposo branco.

Embora a contribuição do treinamento físico em relação ao *browning* possa ser questionável, pois o exercício físico já é termogênico em si, parece contraditório que ele

consiga aumentar a produção de calor, atribuindo características marrons ao tecido adiposo branco, porém em resposta ao treinamento de alta intensidade (70-85% de V_{pico} do VO_2) foi verificado que a atividade do sistema nervoso simpático é aumentada, elevando a liberação de catecolaminas que atuam principalmente na via de sinalização *beta-3* adrenérgica, que esta relacionada com a via de ativação da termogênese induzida principalmente pelo frio, demonstrando que o treinamento físico de resistência modula os tecidos adiposos de maneira diferente, pois uma exposição crônica ao exercício físico é capaz de substituir a termogênese sem tremores no tecido adiposo marrom, através das catecolaminas, mas não parece fazer o mesmo no tecido adiposo subcutâneo que apresenta uma característica multilocular que induz ao *browning* após o treinamento (WU et al., 2014).

Portanto, nossa hipótese é de que outros tipos de exercício físico, como o resistido e concorrente, poderiam modular de maneira semelhante ou ainda mais intensa o processo de transdiferenciação ou surgimento de células bege dentro do tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal) e visceral (retroperitoneal).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar se os treinamentos físico aeróbio, resistido e concorrente estimulam o “*browning*” do tecido adiposo branco, inguinal (subcutâneo) e retroperitoneal (visceral), e o tecido adiposo interescapular (marrom).

2.2. Objetivos específicos

Verificar como os treinamentos físicos aeróbio, resistido e concorrente modificam os parâmetros de desempenho.

Determinar no tecido adiposo marrom intraescapular de camundongos sedentários ou submetidos aos treinamentos físicos aeróbio, resistido ou concorrente o peso e a área (μm^2) de inclusões lipídicas.

Determinar no tecido adiposo branco, subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal de camundongos sedentários ou submetidos aos treinamentos físicos aeróbio, resistido ou concorrente:

- o peso (g) e a área (μm^2) dos adipócitos
- a expressão proteica de UCP1 e VEGF por imunohistoquímica;
- quantificar o RNAm de UCP1, TMEM26, EVA1 e CD137;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. TIPOS DE TECIDO ADIPOSEO

3.1.1. O tecido adiposo branco

O tecido adiposo pode ser encontrado em diversas espécies, mas principalmente em mamíferos. Do ponto de vista evolutivo, ele é importante para os animais homeotérmicos, pois além de ser um excelente estoque de energia, permite que animais possam manter a temperatura corporal em ambientes frios (KLAUS, 2001).

Sua especialidade é armazenar lipídeos na forma de triacilgliceróis no citoplasma das células adiposas, sem que isso seja nocivo à integridade funcional da célula, sendo considerado o principal reservatório energético do organismo. Além disso, os lipídeos são hidrofóbicos, por isso podem ser armazenados em grandes quantidades, dispensando a participação de água como ocorre com o glicogênio; isso garante que o tecido adiposo realize um maior fornecimento energético (FONSECA-ALANIZ; ALONSO-VALE, 2006; FONSECA-ALANIZ, et al., 2007). Essas peculiaridades são de fundamental importância à sobrevivência, evolução e capacidade adaptativa no mundo animal (KLAUS, 2001), pois a célula adiposa contém as enzimas necessárias e proteínas que regulam a síntese de ácidos graxos (lipogênese) para estocar triacilgliceróis nos períodos em que exista uma abundância de energia, mas também para que possa mobilizá-los (lipólise) quando houver escassez (VÁZQUEZ-VELA; TORRES, TOVAR, 2008).

Este tecido possui grande plasticidade, já que sua massa pode ser alterada significativamente, não apenas em situações de sobrevivência. Como exemplo, observamos que alguns indivíduos podem ter uma composição de 2 a 3% de tecido adiposo do seu peso total, e indivíduos obesos que apresentam uma variação de 60 a 70% de gordura corporal. Além disso, esses valores ainda podem variar de acordo com o sexo dos indivíduos; em homens essa variação pode ficar entre 9 e 18% e em mulheres entre 22% a 32% (HAUSMAN et al., 2001; KLAUS, 2001).

O tecido adiposo pode oferecer proteção mecânica a diversos órgãos, contra choques e traumatismos externos, além de permitir o deslizamento adequado entre as vísceras e entre os feixes musculares, sem que sua integridade e funcionalidade sejam comprometidas. Ao mesmo tempo, devido à sua distribuição abrangente, incluindo a derme e os tecidos subcutâneos, funciona como um excelente isolante térmico, tendo um papel importante na manutenção da temperatura corporal. (FONSECA-ALANIZ; ALONSO-VALE, 2006).

O tecido adiposo branco já foi considerado somente como um depósito de gordura, mas hoje é visto como essencial à manutenção da homeostase energética, pois exibe um sistema de secreção extremamente ativo, liberando diversos fatores endócrinos e parácrinos denominados adipocitocinas. Essas moléculas exercem diversos efeitos fisiológicos: controle do comportamento alimentar (leptina), modulação da função imune pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL6, IL10), controle da atividade fibrinolítica, modulador da sensibilidade à insulina (adiponectina, resistina), entre outros. Esse caráter endócrino do tecido adiposo pode interferir na fisiopatologia de doenças crônicas, incluindo as doenças cardiovasculares e as doenças metabólicas (SANCHEZ-GURMACHES, GUERTIN, 2014; HENRY et al., 2012; AHIMA, 2006).

O tecido adiposo branco é constituído por duas principais divisões, os depósitos de gordura visceral, subdividido em perirenal, pericervical, mediastino, gonadal, epicárdio, retroperitoneal, omental e mesentérico, e o depósito subcutâneo, subdividido em anterior e posterior (CINTI, 2009). Esses depósitos também apresentam variada expressão de genes entre si, pois apresentam origens embrionárias diferentes, já que o tecido adiposo visceral é de origem mesodérmica intermediária e lateral, enquanto que para o tecido subcutâneo essa questão ainda permanece sem confirmações (CHAU et al., 2014; MACOTELA et al., 2012).

É possível que o tecido adiposo também esteja distribuído em outras áreas do corpo, como no fígado, no músculo esquelético e pâncreas, mais conhecido como acúmulo ectópico de gordura (SUGANAMI et al., 2012), conseqüentemente é relacionado a desordens metabólicas que ocorrem principalmente com a obesidade, mas também com doenças relacionadas a ela (AHIMA, 2006).

No tecido adiposo, além dos adipócitos, é possível encontrarmos uma matriz de tecido conjuntivo de fibras colágenas e reticulares, células do estroma vascular, tecido nervoso, nódulos linfáticos, células imunes como os leucócitos e macrófagos, fibroblastos e pré-adipócitos (HAUSMAN et al., 2001; SANCHEZ-GURMACHES, GUERTIN, 2014). Além disso, é um tecido altamente vascularizado rodeado por capilares que são fundamentais para que o tecido receba fornecimento de oxigênio, nutrientes, hormônios e fatores de crescimento essenciais a expansão saudável do tecido (SUN et al., 2012).

Os adipócitos são derivados de células pluripotentes, células-tronco mesenquimais, e que também têm a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares como, por exemplo, miócitos, condrócitos e osteócitos (HENRY et al., 2012). No ser humano adulto essas células-tronco são encontradas no estroma vascular do tecido adiposo, assim como também podem ser encontradas na medula óssea. Quando essas células são estimuladas apropriadamente, seja *in vivo* ou em cultura celular, elas passam por um processo sequencial e temporal envolvendo várias etapas até se tornarem adipócitos maduros (TANG; LANE, 2012). A diferenciação celular dessas células mesenquimais para pré-adipócitos, e posteriormente, adipócitos maduros é denominada de adipogênese (LOWE; O'RAHILLY; ROCHFORD, 2011).

O recrutamento para uma linhagem de adipócitos *in vivo* pode ocorrer devido a a estímulos como a ingestão nutricional excessiva de energia, que durante um período prolongado parece gerar um sinal (ou sinais) que estimula células mesenquimais a se comprometerem com a diferenciação do fenótipo adiposo, levando a hiperplasia de adipócitos no tecido adiposo (JO et al., 2009, TANG; LANE, 2012).

O tecido adiposo branco é o tipo predominante nos mamíferos e é constituído de células denominadas adipócitos, que quando maduros possuem uma característica unilocular, ou seja, possuem uma única gota de gordura, rodeada por uma borda fina de citoplasma que empurra o núcleo para a periferia da célula circundada pela membrana plasmática (TANG; LANE, 2012; GENESER, 2003). Durante seu desenvolvimento a célula adiposa contém várias gotículas de lipídeos que se coalescem para formar uma única gota, que pode chegar a ocupar cerca de 90% de todo o citoplasma (WALTHER, FARESE, 2012), mas podem ter uma variação quanto

ao seu tamanho, volume e diâmetro, de acordo com a quantidade de triacilgliceróis armazenados (FONSECA-ALANIZ; ALONSO-VALE, 2006), por isso, pode ser encontradas células pequenas ou grandes, com cerca de 15 µm a 100 µm de diâmetro, podendo muitas vezes ser maiores do que as hemácias, células do sistema imune e fibroblastos (CINTI, 2009).

3.1.2. O tecido adiposo marrom

Em 1551 o tecido adiposo marrom foi observado pela primeira vez, por um naturalista suíço Konrad Gessner (1516-1565) que o descreveu como “nem gordura, nem carne” (RICHARD et al., 2012). A primeira evidência do tecido adiposo marrom em recém-nascidos foi descrita por Hatai em 1902 que encontrou um tecido semelhante à estrutura e localização de animais que hibernam e mais tarde após necropsopia em crianças de quatro semanas, encontrando esse tecido em todas elas (TEWS; WABITSCH, 2011). O tecido adiposo marrom é especializado em produzir calor, conhecido também como termogênese sem tremores, tendo uma participação ativa na regulação da temperatura corporal (FONSECA-ALANIZ; ALONSO-VALE, 2006; RAVUSSIN; GALGANI, 2011; WU, COHEN, SPIEGELMAN, 2013). Além do mais, esta sob regulação direta do sistema nervoso simpático (WHITTLE, RELAT-PARDO, VIDAL-PUIG, 2013).

No feto o tecido adiposo marrom se desenvolve durante a gestação e a quantidade de UCP1 aumenta durante o desenvolvimento do embrião. Após o nascimento a quantidade de UCP1 tem picos de abundância ao longo dos nove primeiros meses de vida, declinando posteriormente. O motivo pelo qual os recém-nascidos possuem esse tecido em abundância se deve ao fato de que, tanto os roedores, quanto os humanos, necessitam manter a temperatura corporal após uma redução abrupta na temperatura depois do nascimento (TEWS; WABITSCH, 2011). A temperatura intra-uterina é de cerca de 37 °C e após o nascimento tende a ser mais baixa, próxima a ambiental. Dessa forma, o aparecimento do tecido adiposo marrom, há cerca de 150 milhões de anos, permitiu que os mamíferos mantivessem a temperatura corporal significativamente mais elevada, em relação a temperatura ambiente (RAVUSSIN; GALGANI, 2011). Portanto, o tecido adiposo marrom é responsável,

durante o parto, por proteger o corpo de baixas temperaturas, sem que seja preciso o tremor para produzir calor (NEDERGAARD; BENGTTSSON; CANNON, 2007).

Apesar do tecido adiposo marrom declinar com o aumento da idade, dados obtidos com tomografia de emissão de pósitron, usando 18-fluordesoxiglicose (FDG) (NEDERGAARD; BENGTTSSON; CANNON, 2007) e combinada com a tomografia computadorizada (CYPESS et al., 2009; RICHARD et al., 2012), tem permitido a identificação precisa da distribuição desse tipo de tecido em humanos adultos e os principais depósitos são nas regiões supraclavicular e do pescoço (Figura 1). Essas regiões estão duas vezes mais presentes em homens adultos, embora existam estudos, como o de Cohade et al., (2003) que ao comparar homens e mulheres, verificaram que as mulheres tem uma maior quantidade de tecido adiposo marrom, que foi ativado devido ao estresse agudo ao frio durante o tempo de captação de 18-fluordesoxiglicose. Portanto, a exposição à baixas temperaturas parece aumentar os estoques desse tecido, tornando essa adaptação mais proeminente em mulheres do que em homens (CYPESS et al., 2009).

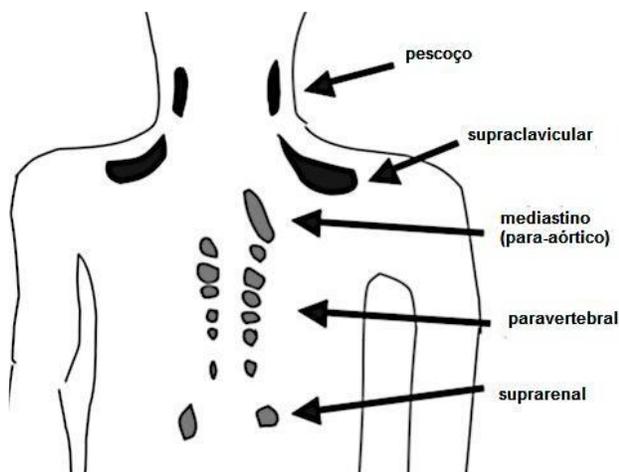


Figura 1. Sítios de captação de 18-fluordesoxiglicose correspondentes a depósitos de tecido adiposo marrom em humanos adultos. As áreas em preto são aquelas mais frequentemente descritas, as zonas cinzas nem sempre são encontrados (Modificado de NEDERGAARD; BENGTTSSON; CANNON, 2007).

Quanto a localização, ainda de acordo com Ravussin e Galgani (2011), o tecido adiposo marrom pode ser classificado em depósito discreto e difuso. A localização

discreta é encontrada em cérvico-supraclavicular (que é a localização mais comum), perirenal e supra-renal, além das regiões paravertebrais em torno dos grandes vasos (aorta e seus ramos principais: carótidas, subclávias, intercostais e artérias renais), e provavelmente está presente para gerar e distribuir calor, mas também manter a temperatura central. Já na localização difusa o tecido adiposo marrom é encontrado em coexistência com o tecido adiposo branco e o tecido muscular esquelético. Seu declínio ocorre com o avanço da idade, que parece estar correlacionada inversamente com o índice de massa corporal.

Do ponto de vista clínico a confirmação da existência do tecido adiposo marrom levou a hipótese de que a obesidade e suas co-morbidades como o diabetes e doenças cardiovasculares, talvez pudessem ser tratadas, estimulando a atividade desse tecido, aumentando o gasto energético e reduzindo os estoques de tecido adiposo branco, principalmente o visceral (WHITTLE, RELAT-PARDO, VIDAL-PUIG, 2013).

Os adipócitos marrons têm cerca de 60 μm de diâmetro, e geralmente são menores do que os adipócitos brancos, se caracterizam pela presença de várias gotículas lipídicas (organização multilocular) com diferentes tamanhos no citoplasma, possuindo um núcleo esférico e ligeiramente excêntrico, com um número elevado de mitocôndrias. Essas organelas possuem o complexo enzimático necessário para a síntese de ATP com baixa atividade, e utilizam a energia liberada pela oxidação, principalmente dos ácidos graxos, para gerar calor preferencialmente (FONSECA-ALANIZ; ALONSO-VALE, 2006).

As mitocôndrias são organelas intracelulares que estão envolvidas em diversos processos celulares, que incluem desde o metabolismo, crescimento, sinalização, proliferação e morte celular (TO et al., 2010). Elas são encontradas em todas as células, com exceção das hemácias, e são responsáveis em converter os substratos energéticos, como a glicose e os lipídeos, em moléculas de ATP a fim de abastecer e atingir as demandas energéticas do organismo. Contudo, as mitocôndrias do tecido adiposo marrom são as únicas que exibem quantidade abundante de UCP1, uma proteína localizada na membrana interna da mitocôndria que contribui com a produção de calor (FARMER, 2009). Esse processo de geração de calor ocorre porque a UCP1, atua como um canal de prótons que descarrega a energia gerada pelo acúmulo de

prótons do espaço intermembranoso das mitocôndrias durante os processos oxidativos do ciclo de Krebs, desviando-os da ATP sintase, o que impede a síntese do ATP, e permite que o calor seja dissipado. Os adipócitos marrons são assim denominados justamente devido a sua coloração marrom, que ocorre devido as altas concentrações de citocromo oxidase das mitocôndrias (FONSECA-ALANIZ; ALONSO-VALE, 2006).

Foi demonstrado que tecido adiposo marrom tem origem mesodérmica (CHAU et al., 2014). Estudos em modelos animais chegaram a conclusão de que as células marrons em sua origem embrionária são derivadas a partir de uma linhagem semelhante de um gene determinado de fator miogênico 5 (*Myf5*), uma proteína específica e chave na regulação e diferenciação muscular (SABOURIN, RUDNUCKI, 2000; SEALE et al. 2008).

3.1.3. O tecido adiposo bege

O tecido adiposo branco e o tecido adiposo marrom estão anatomicamente localizados em locais diferentes, tanto em humanos, quanto em roedores, porém, recentemente identificou-se a existência da expressão gênica positiva para UCP1 dentro do tecido adiposo branco subcutâneo (WU, COHEN, SPIEGELMAN, 2013), assim como a expressão de *myf5*, que é membro da família de genes de determinação específica para músculo durante a fase embrionária (SEALE et al., 2008).

As células que são precursoras do tecido adiposo (células tronco) expressam *paired box 7* (*Pax7*) e embora apresentem essa expressão, o que as diferenciam em brancas, marrons ou bege é expressão de *Myf5*. Enquanto células brancas e beges são negativas para *myf5*, as células marrons são positivas (LIDELL, BETZ, ENERBACK, 2013; LEPPER, FAN, 2010). As células bege podem não apresentar o mesmo perfil de expressão embrionária em todos os depósitos de gordura branca, assim como observado por Sanchez-gurmaches e Guertin (2014). Tais diferenças são importantes, já que os adipócitos denominados bege podem apresentar diferentes origens e, por consequência, diferentes características como quantidade de fibras nervosas, vascularização, condições de exposições ambientais. Acredita-se que geralmente a gordura subcutânea é a que tipicamente apresenta quantidades te células bege,

ocorrendo principalmente pela estimulação ao frio e a receptores β 3-adrenérgicos (LIDELL, BETZ, ENERBACK, 2013).

A expressão de *PR Domain Containing 16* (PRDM16) também parece desempenhar um papel fundamental na regulação e desenvolvimento de células bege e marrons, pois ela induz a expressão de *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC1- α), responsável pela regulação da biogênese mitocondrial nessas células (SEALE et al., 2007). Também é possível verificar que a expressão de PRDM16 claramente é mais abundante no tecido adiposo marrom em comparação com o tecido adiposo subcutâneo e mais discreta em relação aos tecidos adiposos viscerais (JONG et al., 2015).

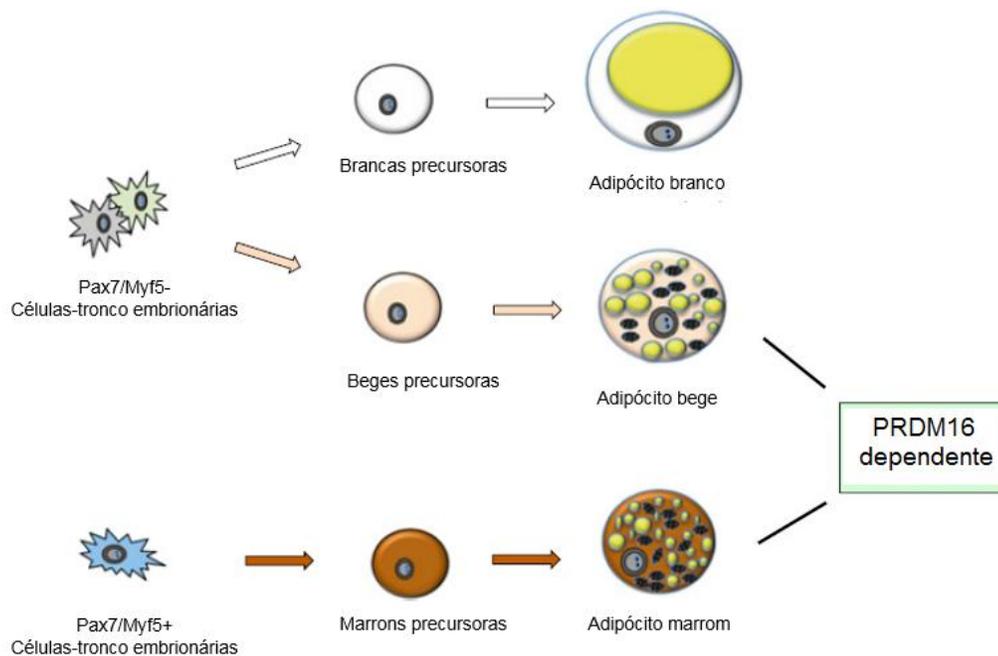


Figura 2. Origem das células adiposas. Existem pelo menos três precursores que dão origem a células adiposas brancas, bege e marrom separadamente. Os precursores de adipócitos marrons expressam Pax7 e Myf5+. Adipócitos brancos e de cor bege vem de duas populações distintas de precursores de linhagens Pax7 e Myf5- (Modificado de WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013).

Outros pesquisadores, que isolaram células bege dos depósitos inguinais e gonadais do tecido adiposo branco de camundongos 129VSE, observaram que além da grande expressão de RNAm de UCP1, elas também expressam proteínas características do fenótipo de adipócitos marrons, como a Cidea e a PGC1- α (WU et al., 2012). Por causa dessas observações esses adipócitos foram caracterizados como uma terceira população, e denominados de bege, pois preservam características metabólicas intermediárias (WU et al., 2012). Essas células possuem uma morfologia multilocular, semelhante as células adiposas marrons, e tem um alto teor de mitocôndrias, assim como a expressão de um conjunto de genes, como a UCP1, portanto, elas parecem ter uma capacidade termogênica similar (ISHIBASHI, SEALE, 2010).

De acordo com Wu et al., (2012) alguns genes parecem ser seletivos somente aos adipócitos beges. Isso permite que seja possível diferencia-los de outros tipos de adipócitos, como os adipócitos marrons, pois os adipócitos beges apresentam uma assinatura própria, que incluem níveis elevados de proteínas de superfície celular como a CD137, TMEM26 e a TBX1. Além do mais, esses autores, mostraram que células beges tem uma sensibilidade preferencial aos efeitos de escurecimento mediados pela miocina irisina. Por outro lado, genes como EVA1, Fbxo31 e Ebf3 são mais seletivos a adipócitos marrons.

Consequentemente, o que temos aqui, é que adipócitos beges podem ocorrer tanto por meio da transdiferenciação, quanto serem adipócitos originalmente beges, de acordo com a marcação de genes específicos para cada tecido (LIDELL, BETZ, ENERBACK, 2013; WU et al., 2012). Sendo assim, as análises em relação a essas diferenças podem ser dificultadas, visto que os três tipos de adipócitos podem coexistir na mesma região.

3.1.4. Alterações na plasticidade do tecido adiposo associado ao exercício físico

Existem diversas recomendações de saúde pública que reconhecem o exercício físico regular e a atividade física como meio de prevenção, gestão e tratamento de diversas doenças crônicas (STANFORD, MIDDELBEEK, GOODYEAR, 2015). Os

benefícios advindos de sua prática ocorrem devido a remodelação metabólica e molecular em diversos órgãos e tecidos, de acordo com o tipo de exercício realizado (COFFEY, HAWLEY, 2007). O movimento repetido das contrações musculares, associado à frequência do exercício físico são potentes estimulantes para adaptações fisiológicas que vão desde o aumento da biogênese mitocondrial até o controle da expressão de genes envolvidos no metabolismo (EGAN, ZIERATH, 2013).

O treinamento físico, definido por movimentos repetidos durante um período de dias, semanas ou anos, pode provocar efeitos na morfologia do tecido adiposo branco, independentemente de alterações significativas na perda de peso (STANFORD, MIDDELBEEK, GOODYEAR, 2015). Dentro desse contexto o exercício físico também estimula a reorganização/redução da massa do tecido adiposo, sobretudo devido a mobilização de ácidos graxos (lipólise), pois esses se caracterizam como um importante substrato energético utilizado pelos músculos durante o exercício prolongado, com intensidade de 60 a 65% do $VO_{2máx}$. (COFFEY, HAWLEY, 2007).

A duração e intensidade do exercício físico estimulam o sistema nervoso simpático e a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) para os receptores β -adrenérgicos que são acoplados a proteína G que ativa a Adenil ciclase, que ativa a AMPc, proteína quinase A, e a p38MAPK, que conseqüentemente ativa as enzimas que estimulam a lipólise, tais como a lipase hormônio-sensível, lipase de triacilglicerol e lipase monoacilglicerol (ZOUHAL et al., 2008).

Por isso, ao realizar o exercício físico, os receptores β -adrenérgicos são ativados tanto durante uma sessão aguda de exercício físico podendo levar ao recrutamento de tecido adiposo bege no tecido adiposo branco, embora essas observações só tenham sido realizadas em roedores, em humanos ainda tem poucos estudos que investigam tanto a atividade do tecido adiposo marrom quanto a presente do tecido adiposo bege (SHANCHEZ-DELGADO et al., 2015).

Durante o período prolongado de exercícios físicos o tecido adiposo pode ter redução do seu tamanho e de suas células, portanto, o exercício físico parece promover um remodelamento desse tecido (THOMPSON, et al., 2012). Na tentativa de melhor entendermos os fatores que podem ser determinantes para este remodelamento do tecido adiposo branco, surge a denominação de *browning*. Num elegante estudo

conduzido por De Matteis et al. (2013), os autores observaram que o exercício físico foi capaz de conferir ao tecido adiposo visceral (retroperitoneal e epididimal), de roedores, características funcionais exclusivas do tecido adiposo marrom. Com apenas uma semana de exercício de corrida, ou seis semanas de treinamento físico aeróbio, os níveis celulares de UCP1 bem como outros marcadores fenotípicos do tecido adiposo marrom aumentaram consideravelmente. Um dos mecanismos propostos para essa transdiferenciação do adipócito branco, ao que parece, é influenciado por um hormônio recentemente descrito produzido pelo músculo esquelético, a irisina (BOSTRÖM et al. 2012). A produção da irisina em animais é modulada pela PGC1- α , um fator de transcrição expresso no músculo, também encontrado no tecido adiposo, envolvido com o aumento da expressão de proteínas da cadeia respiratória mitocondrial e enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos resultando num fenótipo semelhante aos adipócitos marrons (SUTHERLAND et al., 2009).

Boström, et al., (2012) mostraram que a irisina é induzida durante o exercício, promovendo modificações no tecido adiposo subcutâneo de roedores, estimulando a expressão de UCP1 em níveis plasmáticos em animais que foram submetidos a três semanas do treinamento em roda involuntária, promovendo o escurecimento do tecido adiposo branco, ou seja, dando origem a células bege. Tais adaptações são essenciais para o tecido adiposo branco, pois ele se torna mais oxidativo e ao mesmo tempo mais termogênico (VILLARROYA, 2012) (FIGURA 3). Ademais, parece existir uma correlação positiva entre a intensidade do exercício físico aeróbio e a capacidade secretória de irisina, demonstrada em seres humanos jovens e saudáveis (TSUCHIYA et al., 2014).



Figura 3. Esquema representando o efeito da Irisina sobre o tecido adiposo branco. A irisina é liberada no músculo esquelético, principalmente após exercícios físicos, desencadeando a diferenciação de células precursoras, presentes do tecido adiposo branco, em células com características de adipócitos marrons com alta abundância de UCP- 1, gotículas multiloculares de gordura e mitocôndrias (Modificado de VILLARROYA, 2012).

Outro aspecto interessante nessa imensa capacidade adaptativa do tecido adiposo branco é o efeito que exercício parece provocar sobre o tecido adiposo marrom. Em estudo realizado por Xu et al., (2011), os autores verificaram que o exercício físico realizado por oito semanas, em esteira rolante, com camundongos C57BL/6, aumentou o número de células progenitoras que dão origem a esse tecido. Esse achado é importante, pois o tecido adiposo marrom também é visto como um possível modulador do gasto energético, e por isso contribui em prevenir, ou reduzir, a obesidade.

Já em humanos, Vijgen et al., (2012) demonstraram que após uma cirurgia bariátrica de pacientes obesos o tecido adiposo marrom foi aumentado em quatro dos dez pacientes, indicando que o recrutamento desse tecido pode ocorrer. Yoneshiro et al., (2013) também verificaram um aumento da atividade termogênica do tecido adiposo marrom em humanos após exposições ao frio de 17°C durante duas horas por dia, ao longo de 6 semanas, com comitente perda do gordura corporal e Vosselman et al., (2015) ao realizar um estudo controle com humanos, comparou a atividade do tecido adiposo marrom e o escurecimento do tecido adiposo branco abdominal subcutâneo de homens treinados em endurance a pelo menos dois anos, com homens sedentários e

observou que a atividade do tecido adiposo marrom era menor em homens que realizam o exercício de endurance do que nos sedentários, enquanto que a expressão de irisina, obtida do músculo esquelético vasto lateral, era cerca de 1,6 vezes maior, porém a expressão de RNAm de genes relacionados com adipócitos beges e marrons, como UCP1, PGC-1 α e *Cidea*, TMEM26 e CD137 não apresentaram diferenças, concluindo portanto que o recrutamento desses adipócitos pode não estar relacionado com o exercício de resistência em seres humanos, mas sim relacionada com a redução da atividade metabólica do tecido adiposo marrom em humanos.

Recentemente mostrou-se que a exposição a determinados fatores do ambiente, seja o frio ou o exercício, induzem o aparecimento de adipócitos beges no tecido adiposo inguinal e visceral, que são comumente referidas de escurecimento (*browning*) ou *beiging* do tecido adiposo branco (SUTHERLAND et al., 2009).

3.2. TIPOS DE EXERCÍCIO FÍSICO

3.2.1. Exercício aeróbio

Programas de exercício que tendem a aumentar a potência aeróbia normalmente estão relacionados com exercícios de corrida, ciclismo, natação, esqui, entre outros, e geralmente tem duração entre 20 e 60 minutos por sessão, sendo realizados de três a cinco vezes por semana numa intensidade que varia de 50-85% do VO_{2máx} (ACMS, 2006). Os treinamentos físicos aeróbios ainda podem ser divididos em três intensidades, são elas: intensidade baixa, moderada e alta (BANGSBO, 2015). Além do mais, existe uma recomendação de que esse tipo de exercício seja realizado, pelo menos, 250 minutos por semana para que exista controle da massa corporal (DONNELLY et al., 2003).

Os treinamentos de *endurance* causam efeitos tanto centrais quanto adaptações periféricas, que resultam em aumento nos estoques de glicogênio muscular e, ao mesmo tempo, como poupador deste substrato em trabalhos submáximos por privilegiar o uso de ácidos graxos como fonte energética. Há também melhora da cinética de lactato e alterações morfológicas que incluem o aumento da densidade de fibras do tipo I por área muscular e aumento da capilaridade (COFFEY; HAWLEY, 2007). Por fim, há maior biogênese mitocondrial (JUNG; KIM, 2014; WU et al., 2002) associada a

otimização do uso dos substratos que realçarão a capacidade oxidativa, aumentando a resistência a fadiga e aperfeiçoando o fenótipo de *endurance* (COFFEY; HAWLEY, 2007).

Durante a corrida de *endurance* a performance em corridas de longa distância tendo como predominante o sistema oxidativo e responsável por produzir energia (JONES; CARTER, 2000). O índice fisiológico é um fator influenciável durante a *performance* de corrida, e pode variar de acordo com a distância percorrida. (HILL, ROWELL, 1996). Existem vários tipos de índices fisiológicos descritos na literatura como os limiares de lactato, limiar anaeróbio, a máxima fase estável de lactato e a velocidade referente à ocorrência do consumo máximo de oxigênio (vVO_{2max}) (MACHADO et al., 2011; MCLAUGHLIN et al., 2010; MIDGLEY; MCNAUGHTON; JONES, 2007), mas um dos índices fisiológicos mais utilizados e estudados para a predição de performance em corrida é o VO_{2max} , que refere-se a mais alta taxa no qual o oxigênio é captado, transportado e utilizado pelo corpo, durante o exercício. Desta forma, o VO_{2max} refere-se a medida da quantidade máxima de energia que pode ser produzida pelo metabolismo aeróbio em determinada unidade de tempo, caracterizando a potência aeróbia do indivíduo (CAPUTO et al., 2009). Para a determinação do VO_{2max} é necessária a realização de testes incrementais máximos, com análise direta de gases expirados (ACSM, 2006), contudo, esses métodos são caros, pois necessitam de equipamentos que sejam específicos para tal aferição. Todavia, mesmo a VO_{2max} sendo considerado um determinante fisiológico da *performance* aeróbia de corredores de *endurance* em grupo homogêneo de corredores essa variável apresentou pouco poder discriminatório da *performance* (SOUZA et al., 2011).

Outro parâmetro, denominado de V_{pico} , vem ganhando espaço como um efetivo preditor de *performance* em corrida de *endurance*, (MCLAUGHLIN et al., 2010; STRATTON et al., 2009; SLATTERY et al., 2006), visto que é uma variável simples de ser determinada e não necessita do uso de equipamentos de custo elevado e técnicas que sejam invasivas (SCOTT; HOUMARD, 1994). A V_{pico} é a máxima velocidade atingida em um protocolo incremental (MCLAUGHLIN et al., 2010), e permite que ajustes sejam realizados por meio de equações que levam em conta a velocidade do último estágio completo ($km \cdot h^{-1}$), o tempo em que o participante permaneceu no estágio

incompleto (segundos), a duração de cada estágio (segundos) e o incremento em cada estágio ($\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$) (KUIPERS et al., 2003), se apresentando altamente confiável, quando definida dessa maneira, podendo ser utilizada para monitorar os efeitos do treinamento (PESERICO, ZAGATTO, MACHADO, 2013).

Estudos têm correlacionado a V_{pico} com a predição de *performance* em corridas de 16 km (MCLAUGHLIN et al., 2010), de 10 até 90 km (NOAKES, MYBURGH, SHALL, 1990), e em provas mais curtas, 3 km e 5 km (STRATTON et al., 2009; SLATTERY et al., 2006). Isso nos demonstra que além de ter boa correlação com a corrida de *endurance* e com mudanças relacionadas a $\text{VO}_{2\text{máx}}$ (MCLAUGHLIN et al., 2010), a V_{pico} pode ser utilizada como parâmetro de avaliação do efeito do treinamento, além de servir como referencial para a prescrição do treinamento de corrida, tanto de forma contínua quanto de forma intervalada (BUCHHEIT et al., 2010; MIDCLEY; MCNAUGHTON; JONES, 2007).

Machado et al., (2013), também definiram em seu estudo que durante o protocolo de testes incrementais para definir a V_{pico} durações de 3 minutos, para cada estágio do teste incremental são mais preferíveis do que durações mais curtas, de 1 ou 2 minutos, pois tem uma melhor correlação da *performance* em corredores que fazem provas de 5km e 10km.

3.2.1. Exercício resistido

O treinamento resistido faz parte de programas de exercícios que visam melhorar a saúde, por apresentar efeitos positivos sobre os músculos alvos e áreas ósseas (KRAEMER, FRAGALA, 2006). O aumento da área de secção-transversa do músculo atrelado a alteração nos padrões de recrutamento neural representam as principais adaptações decorrentes da orática de exercícios resistido (COFFEY; HAWLEY, 2007).

Assim como os demais tipos de exercício, o exercício resistido tem em seu cerne alguns princípios como carga e volume, e essas características podem variar de forma periodizada, a fim de maximizar o princípio da sobrecarga, garantindo então a relação entre o esforço e o descanso e respeitando as individualidades, necessidades e objetivos (KRAEMER; FRAGALA, 2006). A carga é o peso atribuído ao conjunto de exercício e pode ser um dos aspectos mais críticos de um programa de treinamento,

visto que existe uma relação inversa entre quantidade de peso levantado e números de repetições realizadas (LORENZ; REIMAN; WALKER, 2010). Portanto, um conjunto de cargas específicas deve ser visada para uma formação específica também.

O volume de treinamento se dá pelo somatório do número total de repetições realizadas durante uma única sessão de treinamento que é multiplicada pela resistência (quilogramas) e isto reflete o estresse pelo qual os músculos são submetidos (TRAN, DOCHERTY, BEHM, 2006)

Para que haja ganhos com o programa de exercícios resistido é preciso que exista progressão de cargas e isso torne os indivíduos capazes de gerar mais força e potência ao longo do tempo. Portanto, para que ocorra melhoras contínuas nas funções fisiológicas os aumentos de carga precisam ser aplicados para induzir novas adaptações (LORENZ, REIMAN, WALKER, 2010).

É importante ressaltar que aumentos de cargas progressivas devem ser realizados nos exercícios resistidos para produzir sobrecarga, mas é importante que não leve o indivíduo a um estado de *overtraining* (KRAEMER, FRAGALA, 2006)

Existem diversos métodos para se aumentar a carga progressiva, que por consequência aumentam a resistência como, por exemplo, aumentar volume ou número de repetições, séries, aumento de exercícios, período de repouso, ou aumento da velocidade de execução; entretanto, o método mais comum de se fazer isso é aumentar a resistência, ou seja, a carga (LORENZ, REIMAN, WALKER, 2010) progressivamente no programa de exercícios. De acordo com o *American College of Sport Medicine* (2006) é recomendado que mudanças no volume total do treinamento sejam feitas na mudança do volume total do treinamento (repetições, séries e cargas), de um jeito que os incrementos se dêem entre 2,5% a 5% (de carga) por semana para que o *overtraining* seja evitado.

O exercício resistido (de duração de 60 minutos, com três exercícios diferentes para parte superior e inferior do corpo calculado em 65-80% de uma repetição máxima, de 10 a 12 repetições, com velocidade moderada e descanso de um minuto entre as sessões) é capaz de aumentar significativamente as concentrações de irisina e melhorar a composição corporal, resultante do aumento da massa magra e diminuição da massa gorda quando comparado com o exercício aeróbico (de duração de sessenta

minutos a 65%-85% de um HR_{máx}) de adultos obesos e com sobrepeso (KIM et al., 2015).

Ainda em se tratando de exercícios de resistência, é importante lembrar, que ele pode ser direcionado à força, potência, hipertrofia ou à resistência, por isso é preciso que se faça um planejamento adequado ao objetivo (LORENZ; REIMAN; WALKER, 2010).

3.2.3. Exercício concorrente

O treinamento concorrente é definido pela incorporação dos treinamentos aeróbios e resistido, muitas vezes utilizado com a finalidade de melhorar a força, potência e/ou hipertrofia concomitantemente com uma melhora da capacidade aeróbia (FYFE; BISHOP; STEPTO, 2014). Essas combinações de exercícios são utilizadas em programas que visam a perda de massa, além de afetar parâmetros metabólicos de maneira positiva (FOSCHINI et al., 2010).

Existem algumas formas de combinar esses exercícios para que sejam considerados como um treinamento concorrente, assim, eles podem ser realizados na mesma sessão de treinamento, ou no mesmo dia em horários diferentes (BANGSBO, 2015), ou ainda, combinados em dias diferentes na mesma semana, ou plano de treinamento (COFFEY, HAWLEY, 2007).

Exercícios de resistência ou de *endurance* representam modos distintos, tanto em relação aos estímulos quanto as adaptações que são induzidas no organismo, já que ativam vias de sinalização moleculares também distintas, e específicas (FYFE, BISHOP, STEPTO, 2014). O que pode ocorrer é um *cross-talk* entre essas vias de sinalização, específicas a cada treinamento, como por exemplo, durante o treinamento aeróbio pode-se ativar vias de sinalização de cálcio quinase dependente de calmodulina e por fim acabam por inibir a *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), que é um regulador chave no crescimento muscular e, portanto, a síntese de proteínas relacionada com a hipertrofia muscular pode ser prejudicada quando os dois tipos de treinamentos são aliados (BANGSBO, 2015).

Além do mais, o treinamento resistido não leva à biogênese mitocondrial, mas sim a um aumento da área de secção transversa do músculo, o que dificulta a difusão

do oxigênio e dos substratos, não favorecendo a capacidade de *endurance* (COFFEY; HAWLEY, 2007).

Embora seja atrativa a ideia de realizar o treinamento concorrente para que o indivíduo possa se beneficiar de ambas adaptações, do treinamento aeróbio e resistido, é possível verificar, desde a clássica investigação realizada por Hickson (1980), que o treinamento físico concorrente compromete as adaptações, quando comparado a um dos treinamentos realizados isoladamente, e embora o aumento da $VO_{2máx}$ não seja afetado, existe uma diminuição da capacidade de desenvolver aumentos de força. Contudo, em estudos com humanos tem sido difícil encontrar evidências dessa ligação (COFFEY, et al.,2009), ou seja, o quanto o treinamento aeróbio pode influenciar a hipertrofia muscular.

4 MÉTODOS

4.1. Animais

O protocolo envolvendo o uso de animais foi submetido ao Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá para avaliação dos aspectos éticos envolvidos neste trabalho, sob o protocolo nº 005/2014 (Anexo I).

Foram utilizados 120 camundongos da linhagem Swiss, machos, com 35 dias de vida, que foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram alojados em gaiolas individuais, em sala automatizada para controle de fotoperíodo (ciclo claro e escuro) de 12/12 horas (período claro foi iniciado às 6 horas), com temperatura controlada de 20 a 24°C, com fornecimento de ração padrão balanceada e água *ad libitum*.

4. 2. Protocolos de treinamento

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais com 30 animais cada: grupo controle sedentário (SED); grupo camundongos submetidos ao treinamento aeróbio (AER); grupo camundongos submetidos ao treinamento resistido (RES), grupos camundongos submetidos ao treinamento concorrente (CON).

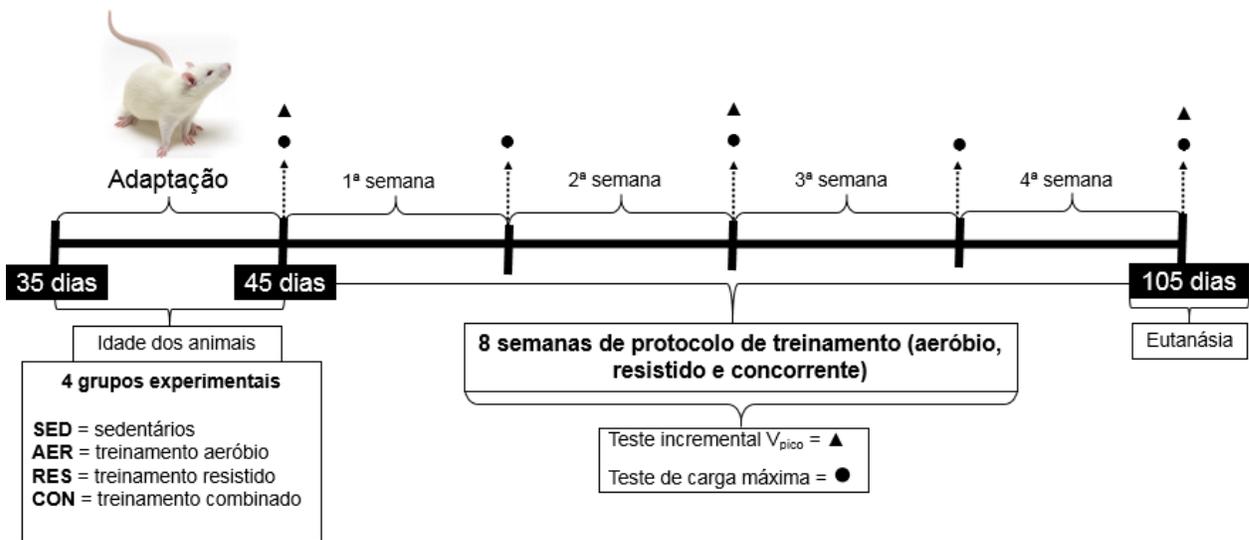


Figura 4. Esquema representativo do desenho experimental

4.2.1. Treinamento físico aeróbio

Inicialmente os animais foram submetidos a três dias de adaptação a esteira ergométrica programável (Inbrasport, Porto Alegre, Brasil) adaptada para acomodar 10 camundongos simultaneamente, e ao exercício físico proposto, realizado a uma velocidade inicial de 0,3 até chegar a 0,6 km/h com duração inicial de 20 minutos até chegar a 30 minutos.

Após o período de adaptação foi realizado um teste incremental para a determinação da máxima velocidade alcançada (V_{pico}), correspondente a 100%. O teste incremental para a determinação da V_{pico} constitui-se de sucessivos acréscimos de 0,3 km/h a cada três minutos até a exaustão do animal, caracterizada pela ausência de corrida do camundongo no terço final da raia por mais de 10 segundos (AOKI; BELMONTE; SEELANDER, 2003), realizado em esteira própria para roedores *Panlab*® (Barcelona, Espanha).

O teste incremental foi realizado quinzenalmente para a prescrição do protocolo de treinamento aeróbio com duração de 8 semanas, realizado 5 vezes por semana, a partir das 16 horas. A velocidade foi ajustada a 70% da V_{pico} e adaptado ao protocolo de treinamento estabelecido por Iwamoto et al. (2004), iniciado a 30 minutos na primeira semana até que chegasse a 60 minutos na oitava semana.

4.2.1.1. Determinação da velocidade pico

A V_{pico} foi considerada a máxima velocidade atingida durante o teste incremental, correspondendo a 100%, sendo realizado um ajuste a partir da equação proposta por Kuipers et al. (2003) e adaptada para camundongos, quando o último estágio atingido durante o teste não fosse completado:

$$V_{\text{pico}} = V_{\text{completado}} + t/T \times \text{incremento de velocidade}$$

Essa equação leva em consideração a $V_{\text{completado}}$ correspondente a velocidade do último estágio completado ($\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$); a velocidade do último estágio completado (t é o tempo (segundos) em que animal permaneceu no estágio incompleto; T é a duração total (segundos) de cada estágio; e o incremento de velocidade é a taxa de aumento em cada estágio ($\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$).

4.2.2. Treinamento físico resistido

Inicialmente os animais foram submetidos a três dias de adaptação a escada (reajustada para camundongos), com 105 cm de altura por 5 cm de largura, inclinada a 80° , com espaçamento de 1 cm entre os degraus, uma câmara escura no topo que servia de abrigo durante o repouso entre as séries de escalada; e ao exercício físico proposto.

A adaptação constituiu-se no primeiro dia em apenas deixar os animais dentro da câmara escura com o intuito deles perceberem que o ambiente não oferecia risco, e em seguida eram colocados a uma distância de 20 cm da câmara para subirem até o topo, considerada uma tentativa fácil. No segundo dia os animais eram colocados a 50 cm e no terceiro dia eram colocados a 80 cm de distância, consideradas tentativas média e difícil, respectivamente. Quando necessário foram dados estímulos manuais na cauda do animal para que ele subisse.

Após o período de adaptação foi realizado um teste de carga máxima levantada pelos animais para a prescrição do protocolo de treinamento. O protocolo de treinamento resistido foi realizado semanalmente, com duração de 8 semanas,

realizado 5 vezes por semana, a partir das 16 horas. Os animais eram colocados na porção da escada que possibilita-se a excussão de 8 a 12 repetições, com sobrecarga imposta (dos 100% de carga máxima levantada) de 50% para a primeira série, 75% para a segunda série, 90% para a terceira série, e 100% para a quarta série (da carga máxima levantada) com 60 segundos de intervalos entre as séries, adaptado ao protocolo de treinamento de Hornberge e Farrar (2004).

4.2.2.1 Determinação da carga máxima levantada

O teste para determinação da carga máxima levantada para cada animal constituiu-se inicialmente numa primeira escalada com uma sobrecarga de 75% do peso corporal do animal, com incrementos de quatro gramas (baseado em 10% do peso corporal) adicionado para a execução da série seguinte, até que se chegasse a falha, determinada quando o animal não conseguisse escalar os degraus mesmo após três estímulos consecutivos. A sobre carga foi fixada com duas presilhas, fita adesiva e tudo para inserir esferas de chumbo. Foi determinada por carga máxima levantada a maior carga carregada pelo animal por todo comprimento da escada, correspondendo a 100%. Os testes subsequentes para o reajuste de carga eram realizados no primeiro dia de cada semana, seguindo as séries do protocolo de treinamento (4 séries: 50, 75, 90 e 100% da última carga máxima estabelecida) e adicionados quatro gramas a cada nova série vencida (com intervalo de 120 segundos) até que o animal falhasse e a nova carga máxima fosse ajustada e considerada 100%.

4.2.3. Treinamento físico concorrente

O treinamento físico concorrente combinou elementos do treinamento aeróbio e resistido, ao longo do protocolo de 8 semanas, sendo realizado 5 vezes por semana, realizado a partir das 16 horas, com alternância e prevalência de uma das modalidades em cada semana, por exemplo, na primeira semana foram realizadas três sessões do treinamento resistido e duas sessões do treinamento aeróbio, e na semana seguinte o inverso, seguindo essa alternância até o final do período experimental. Assim sendo, ao fim de 8 semanas, os camundongos realizaram 20 sessões do treinamento resistido e 20 sessões do treinamento aeróbio.

O teste de V_{pico} e carga máxima levantada foram realizados para as duas modalidades da mesma forma como descrita para os treinamentos aeróbio e resistido, realizados quinzenalmente e semanalmente respectivamente.

4.3. Procedimentos Experimentais

Ao final do período experimental os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg por peso corporal de cada animal) e xilazina (15mg/kg por peso corporal de cada animal), administrados via intra-peritoneal, para que em seguida os animais fossem submetidos a uma laparotomia mediana para a remoção do tecido adiposo subcutâneo inguinal (subcutânea), retroperitoneal (visceral) e marrom (interscapular).

4.4. Análises morfométricas

4.4.1. Tecido Adiposo Marrom

Amostras do tecido adiposo marrom interescapular foram fixadas em Carnoy (60% de etanol 100%, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético), desidratadas, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica (BIOTEC® Pinhais, Paraná, Brasil), para a realização de cortes semi-seriados de 5 μm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina (H.E.). As imagens foram capturadas com microscópio *Nikon Eclipse E110*, em objetiva de 40x. Para estimar do percentual de inclusões lipídicas presentes no tecido adiposo marrom interescapular foi realizada captura de 100 imagens/grupos de modo aleatório analisadas utilizando o programas *Image Pro Plus®*, versão 4.5 (Media Cybernetics, USA).

4.4.2. Imunohistoquímica

Amostras do tecido adiposo branco subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal foram fixadas em paraformoldeído 4% e processados para inclusão em parafina para a realização de cortes semi-seriados de 5 μm , em lâminas com polilissina. Em seguida foi realizada a desparafinização e hidratação dos cortes histológicos para bloqueio da peroxidase e subsequente incubação com o anticorpo primário policlonal anti-UCP-1 (ab10983) obtido de coelho (diluição 1:300) subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal e anti-VEGF (ab1316) obtido de ratos monoclonal (diluição de 1:100)

para o tecido adiposo subcutâneo inguinal. A imunoreatividade foi verificada pela quantificação e distribuição relativa do método da atividade da peroxidase revelada por 3,3'-diaminobenzidina como o cromogênio (DAB) (Sigma-Aldrich), que envolve a medição da intensidade da pigmentação expressada por *pixel* da imagem analisadas com um *software* de análise de imagens *Image Pro Plus®*, versão 4.5 (Media Cybernetics, USA).

4.5. Quantificação de RNA mensageiro (RNAm) por qPCR

Para determinação da expressão do mRNA da UCP1, CD137, EVA1 e TMEM26 foram feitas por RT-PCR em Tempo Real. O RNA total dos tecidos adiposos subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal foram isolado utilizando-se o *PureLink® RNA Mini Kit* (Invitrogen® Life Technologies) seguindo-se o procedimento descrito pelo fabricante. A quantificação de RNA nas amostras foram realizada mediante leitura espectrofotométrica da absorbância em 260 nm e as amostras armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A transcrição reversa (RT) foi realizada usando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Invitrogen® Life Technologies) seguindo-se o procedimento descrito pelo fabricante. Todas as incubações foram realizadas em termociclador Eppendorf e o material (cDNA) congelado em *freezer* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da próxima etapa. A quantificação do RNAm dos genes de interesse foi feita pela metodologia de PCR em tempo real utilizando-se o reagente o kit *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Invitrogen® Life Technologies), o sistema de detecção *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA) e pares específicos de *primers* (direto e reverso) para os genes alvos. O gene da RPL19 foi usado como controle interno (*housekeeping*) para normalização das amostras. A expressão relativa dos dados foi calculada pelo método delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ algoritmo) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.6. Análise estatística

Os dados estão apresentados em média \pm desvio padrão (DP); a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste de ANOVA *One-Way* de

medidas repetidas, seguindo com *post hoc* de *Tukey* foi utilizado quando assumida a homogeneidade dos dados. As variáveis de teste e reteste (V_{pico} e dados de carga máxima levantada) foram comparadas realizado o teste de ANOVA mista para medidas repetidas. O teste de *Kruskal-Wallis* foi utilizado quando negada a semelhança. Para as análises inferenciais foi determinado o valor do power pelo *software* Gpower versão 3,1 (Düsseldorf, Germany) e foram refeitas análises de tamanho do efeito representando a diferença média sobre o desvio padrão da diferença, sendo o efeito considerado pequeno quando $\leq 0,2$, médio quando $\leq 0,5$ e grande quando $< 0,8$ (COHEN, 1998), calculado para os grupos treinados em relação ao grupo sedentário. As análises foram realizadas com o auxílio do *Statistical Package for the Social Sciences* versão 17.0 (SPSS Inc. USA) e *Softstatistic* versão 10 e *GraphPad Prism* 5.0. Adotou-se, para todas as análises, nível de significância de $P < 0,05$.

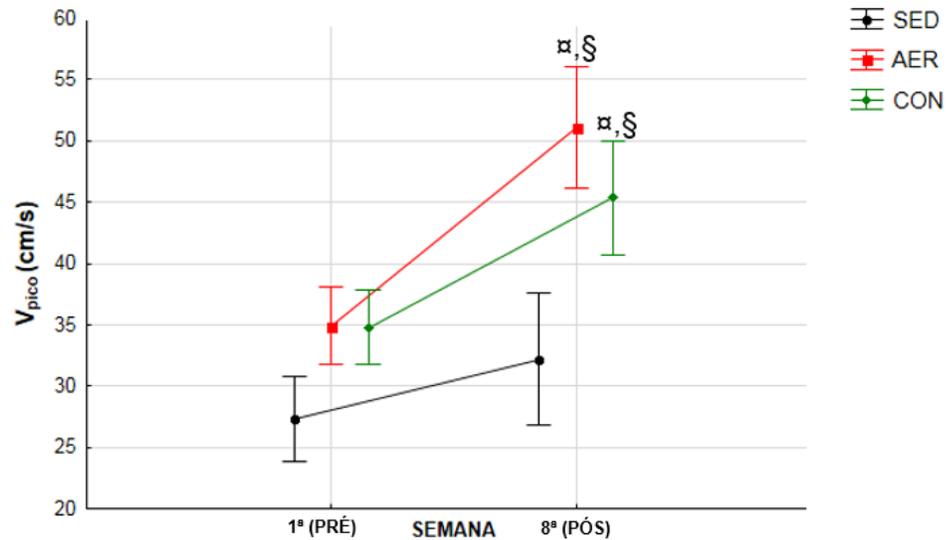
5 RESULTADOS

5.1. V_{pico} e Carga máxima levantada

Na figura 5 (A) é apresentado o teste incremental para determinação da V_{pico} dos animais dos grupos sedentário, aeróbio e concorrente em dois momentos, o pré, primeira semana de treinamento e o pós, ao final das 8 semanas de treinamento. Por análise de variância se verifica diferença significativa entre os momentos (pré e pós) dos grupos aeróbio e concorrente no qual demonstra-se que houve um aumento da V_{pico} ao final do protocolo de 8 semanas, e aumentos significativos de 46,44% para o grupo aeróbio e 30,17% para o grupo concorrente. Nota-se também diferença entre o pós teste dos grupos aeróbio e concorrente em relação ao pós teste do grupo sedentário, no qual os grupos treinados também apresentam aumento significativo de V_{pico} .

Na figura 5 (B) é demonstrado o teste de carga máxima levantada (g) dos animais sedentários, resistido e concorrente. De acordo com análise de variância observa-se diferença estatística significativa em relação aos animais do grupo sedentário e concorrente com os animais do grupo resistido, no momento pré. Verifica-se também diferença significativa entre os momentos (pré e pós) dos grupos de animais resistido e concorrente, com aumentos significativos de 60% e 71,51%, respectivamente. Observa-se ainda diferenças significante do grupo de animais resistido e concorrente com relação ao grupo de animais sedentários e também entre os grupos resistido e concorrente no pós teste, no qual os resultados de carga levantada do grupo resistido é maior.

(A) Teste incremental



(B) Teste de carga máxima

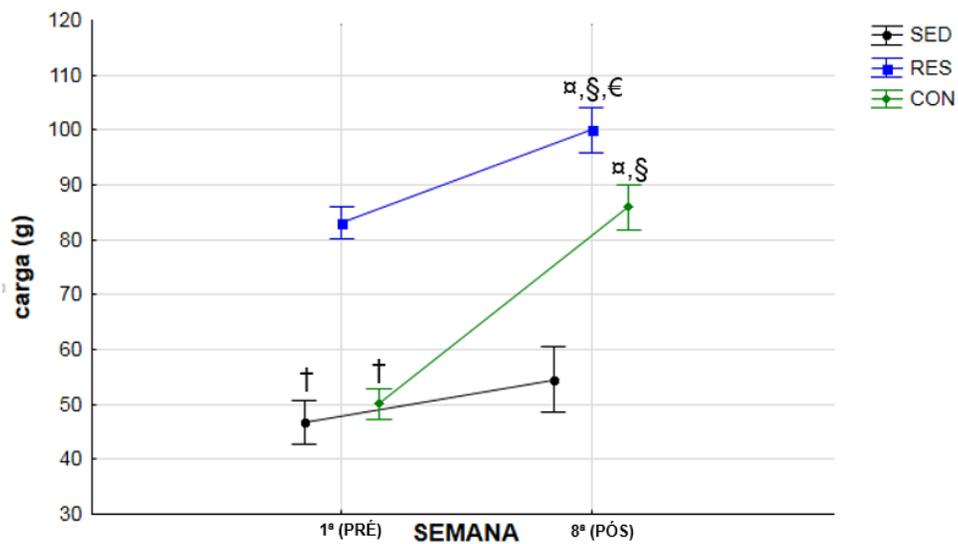


Figura 5. (A) Velocidade máxima alcançada durante o teste incremental; (V_{pico}) em cm/s (B) Teste de carga máxima levantada (g), dos grupos SED= sedentário; e grupos do treinamento AER= aeróbio; RES= resistido e CON= concorrente. Valores expressos como média \pm desvio padrão. α $p < 0,05$ em relação a diferença entre os momentos (pré e pós); \S $p < 0,05$ em relação a SED no pós teste; ϵ $p < 0,05$ em relação a diferença do

grupo COM no pós teste e $t_p < 0,05$ em relação diferença com o grupos RES no pré teste. (n=30 animais/grupo).

5.2. Parâmetros gerais

Para análise de variância, observa-se na tabela 2, que não existe diferença significativa em relação as variáveis de consumo alimentar e peso inicial. Já para os dados de peso final verificou-se diferenças significantes para o animais do grupo resistido, que apresentaram menor peso corporal em relação ao grupo de animais sedentários. Observou-se ainda que houve diminuição significativa do peso final para o grupo aeróbio de 5,22%, do grupo resistido de 6,97% e do grupo concorrente de 5,33% em relação ao grupo sedentário.

Nota-se que para o delta peso corporal, ou seja (peso final – peso inicial) os animais do grupo resistido e concorrente apresentaram diferenças significantes, de menor delta, em relação ao grupo sedentário, enquanto que constata-se reduções significativas de 25% para o grupo aeróbio, 47,9% para o grupo resistido e de 27,2% para o grupo concorrente em relação ao grupo sedentário.

Tabela 1 – Consumo alimentar, peso corporal inicial, peso corporal final e a variação do peso corporal (delta) dos grupos treinados aeróbio (AER), resistido (RES), concorrente (CON) e sedentário (SED).

GRUPOS	SED (n=30)	AER (n=30)	RES (n=30)	CON (n=30)
Consumo alimentar (g)	403,4 ± 45,42	380,60 ± 73,86	376,0 ± 45,03	379,6 ± 35,95
Peso inicial (g)	40,36 ± 3,74	39,71 ± 3,96	40,52 ± 3,34	39,87 ± 3,82
Peso final (g)	47,63 ± 4,37	45,14 ± 3,65	44,31 ± 3,49*	45,09 ± 4,03
Delta peso (g)	7,27 ± 3,11	5,43 ± 2,60	3,79 ± 2,37*	5,29 ± 2,69*

n= número de animais por grupo. Valores expressos em média ± desvio padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SED.

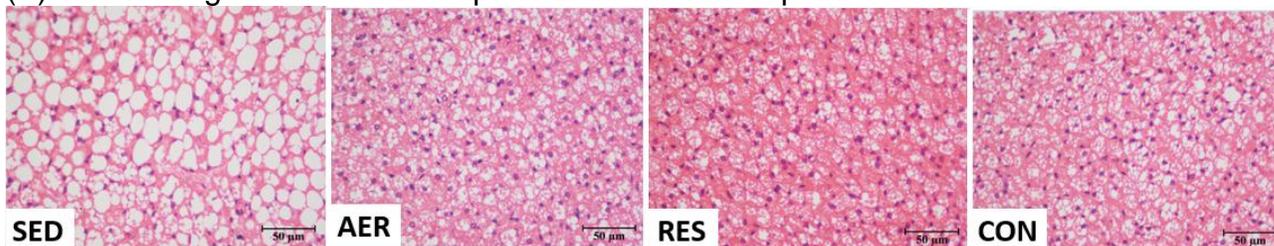
Na figura 6 (A) observa-se a fotomicrografia do tecido adiposo marrom interscapular obtida após coloração com H.E., dos animais sedentários e submetidos ao treinamento físico, onde nota-se a presença de maior espaçamento nos animais do grupo sedentário, que são áreas dos adipócitos ocupados por inclusões lipídicas.

A figura 6(B) refere-se ao peso do depósito adiposo marrom interscapular de animais que realizaram o treinamento e de animais sedentários. Na análise de variância

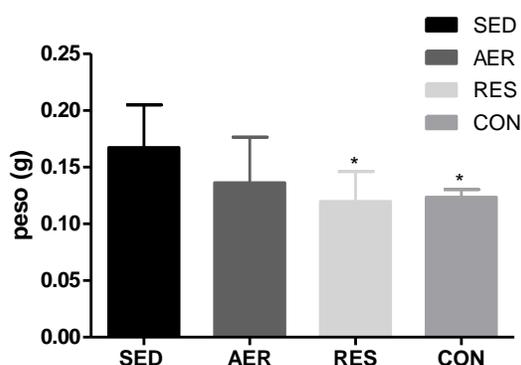
foi detectada diferença estatística significativa, de menor peso de tecido adiposo marrom para os grupos de animais dos grupos resistidos e concorrentes em relação ao grupo de animais sedentários. Verifica-se ainda que esses animais do grupo treinado apresentaram diferenças significativas, no qual tiveram redução de mais de 25% em relação ao grupo sedentário, enquanto que o grupo aeróbio que não apresentou diferença significativa, teve uma redução significativa de 18,5% em relação aos animais sedentários.

A figura 6 (C) demonstra a área ocupada por inclusões lipídicas do tecido adiposo marrom interscapular em μm^2 , no qual observou-se diferença significativa, após teste de análise de variância, para todos os grupos que realizaram treinamento físico com relação ao grupo sedentário, e uma diferença significativa dos grupos treinados me média de 60% menor em relação ao grupo sedentário.

(A) Fotomicrografia do tecido adiposo marrom interscapular



(B) Peso do tecido adiposo marrom interscapular



(C) Área ocupada por inclusões lipídicas no tecido adiposo marrom interscapular

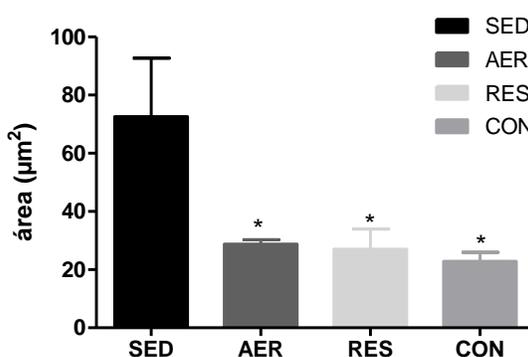


Figura 6. (A) Fotomicrografia do tecido adiposo marrom (interscapular) por coloração de H.E. e aumento original de 40x, (n=5 animais/grupo); (B) peso do depósito de adiposo marrom interscapular (n=10). (C) área ocupada pela inclusão lipídica no tecido adiposo marrom intraescapular (μm^2) (n=5), dos grupos experimentais SED = sedentário, AER= treinamento aeróbio, RES= treinamento resistido e CON= treinamento concorrente. Valores expressos em média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SED.

Na tabela 3 observa-se o peso dos tecidos subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal dos grupos treinados e sedentário. Quando realizou-se análise de variância simples se observa que o peso do depósito inguinal só apresentou diferença significativa em relação aos grupos de animais resistido e concorrente, enquanto que para área do adipócito subcutâneo inguinal, em μm^2 , de todos os grupos treinados foram menores em relação ao grupo sedentário, assim como para os dados de peso do depósito visceral retroperitoneal. Ao se verificar a área do adipócito visceral retroperitoneal, em μm^2 , nota-se que somente o grupo de animais concorrente tiveram diferença significativa com relação ao grupo de animais sedentários.

Tabela 2 - Peso (g) e área (μm^2) dos tecidos adiposos inguinal (ING) e retroperitoneal (RET) dos grupos treinados aeróbio (AER), resistido (RES), concorrente (CON) e sedentário (SED).

GRUPOS	SED (n=30)	AER (n=29)	RES (n=28)	CON (n=30)
Peso ING (g)	0,479 ± 0,231	0,350 ± 0,140	0,305 ± 0,123*	0,293 ± 0,088*
Área ING (μm^2)	2251,6 ± 1048,9	773,4 ± 425,2*	737,5 ± 135,6*	666,7 ± 141,2*
Peso RET (g)	0,361 ± 0,122	0,207 ± 0,078*	0,155 ± 0,085*	0,157 ± 0,065*
Área RET (μm^2)	2.027,8 ± 545,6	1.292,6 ± 603,5	1.229,4 ± 558,7	1.101,1 ± 113,0*

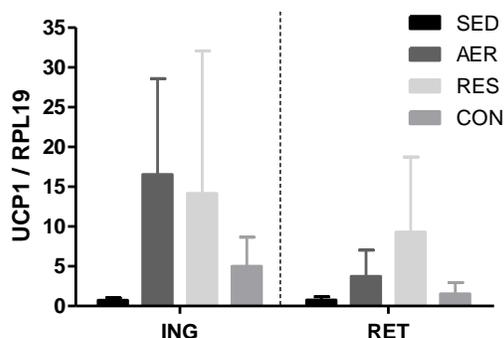
n= número de animais por grupo. Valores expressos em média ± desvio padrão.
*p<0,05 comparado ao SED.

5.3. Imunohistoquímica e qPCR

Na figura 7 (A) é apresentada a expressão de RNAm de UCP1 dos depósitos adiposos subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal de animais que permaneceram sedentário e que realizaram o treinamento físico. Por análise de variância não foram observadas diferenças estatísticas significantes em relação à expressão de RNAm para ambos os depósitos, embora apresentassem expressão significativas de RNAm de 2.113% maior para o grupo aeróbio, 1.795% para o grupo resistido e 569% maior no grupo concorrente para o depósito subcutâneo inguinal, e aumento de 390% para o grupo aeróbio, 1.123% para o grupo resistido e 104% para o grupo concorrente para o

depósito visceral retroperitoneal em relação ao grupo sedentário. No entanto, ao se observar o *d* de Cohen (Figura 7B), como inferência ao tamanho do efeito, verificou-se que em relação ao grupo sedentário, todos os grupos apresentam grande efeito, acima de 0,8, na expressão de RNAm. Já para o depósito visceral retroperitoneal, os grupos resistidos e aeróbico apresentaram um efeito grande enquanto o grupo concorrente um efeito médio, acima de 0,5.

(A) Expressão de RNAm de UCP1



(B) Tamanho do efeito de RNAm de UCP1 em relação ao grupo SED

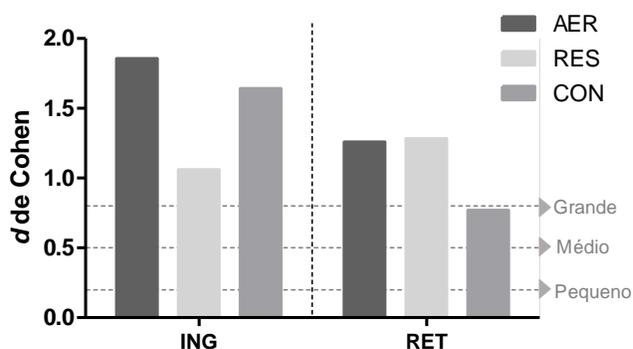
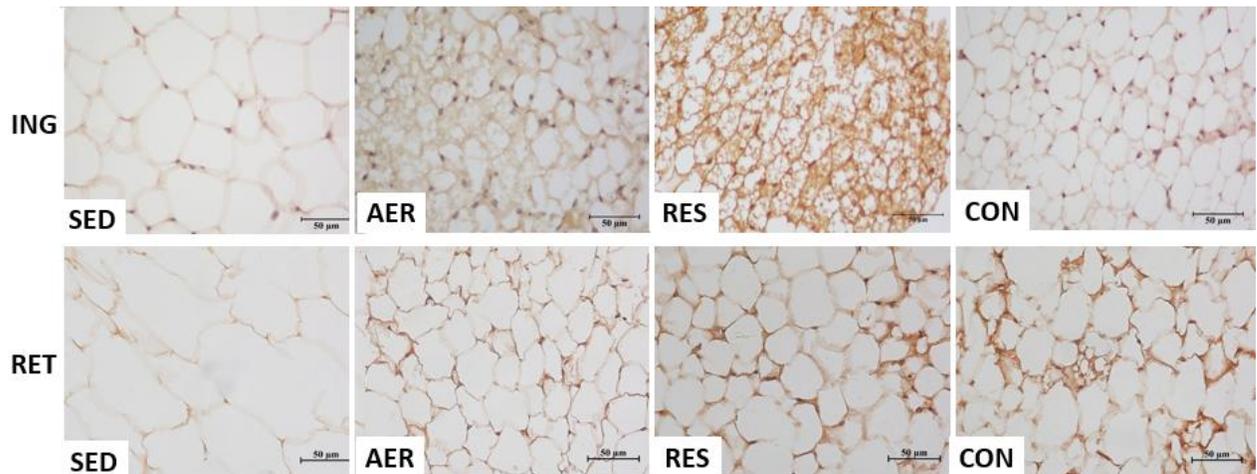


Figura 7. (A) Nível de expressão de RNAm de UCP1; (B) Tamanho do efeito da expressão de RNAm de UCP1 em relação ao grupo sedentário SED; , obtidos pela técnica de qPCR para os depósitos de tecido adiposo subcutâneo inguinal (ING) e visceral retroperitoneal (RET) dos grupos SED= sedentários, AER= aeróbios, RES= resistidos e CON = concorrente. Tamanho de efeito, sendo considerada pequena quando $\leq 0,2$, média quando $\leq 0,5$ e grande quando $< 0,8$. Valores expressos em média \pm desvio padrão, (n=5 animais/grupo).

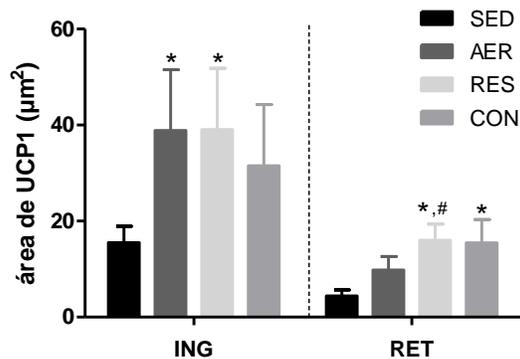
A figura 8 (A) é uma fotomicrografia da imunohistoquímica do tecido adoso branco, para o antígeno de UCP1 nos depósitos subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal. Na figura 8 (B) é apresentada a área (μm^2) ocupada da expressão proteica de UCP1 dos depósitos subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal de animais que realizaram o treinamento físico e que permaneceram sedentário. Na análise de variância foi observado diferenças significantes, no depósito subcutâneo inguinal, que os grupos de treinamento aeróbico e resistido tiveram maior número de área (μm^2) ocupada em relação ao grupo sedentário. Já para o depósito de gordura visceral retroperitoneal os grupos resistido e concorrente apresentaram maior área (μm^2) ocupada em relação ao

grupo sedentário e, ainda, o grupo resistido apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo aeróbio, com uma maior área (μm^2) ocupada. Ao se observar o *d* de Cohen (Figura 8C), como inferência ao tamanho do efeito, verificou-se diferenças significativas em relação ao grupo sedentário, no qual todos os grupos tiveram um efeito grande, ou seja, acima de 0,8, na expressão de UCP1 por área (μm^2) ocupada para ambos depósitos adiposos.

(A) Fotomicrografia da imunohistoquímica de UCP1



(B) Área ocupada (μm^2) de UCP1



(C) Tamanho do efeito da área ocupada (μm^2) de UCP1 em relação ao grupo SED

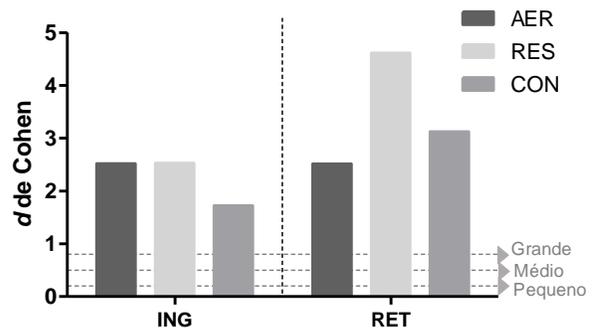


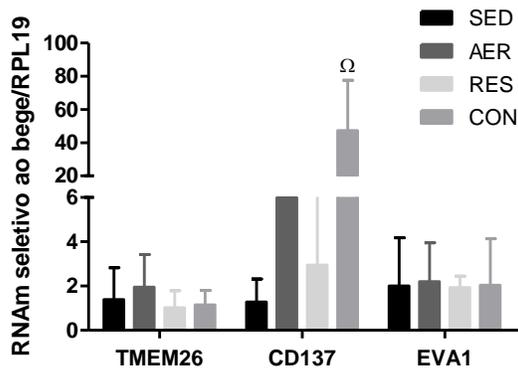
Figura 8. (A) Fotomicrografia da imunohistoquímica de UCP1; (B) Área (μm^2) ocupada de UCP1; (C) Tamanho do efeito da área (μm^2) ocupada de UCP1 em relação ao grupo SED; para os depósitos de tecido adiposo subcutâneo inguinal (ING) e visceral retroperitoneal (RET) dos grupos SED= sedentários, AER= aeróbios, RES= resistidos e CON = concorrente. Tamanho de efeito, sendo considerada pequena quando $\leq 0,2$, média quando $\leq 0,5$ e grande quando $\leq 0,8$. Valores expressos em média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SED; # $p < 0,05$ em relação ao grupo AER. (n=5 animais/grupo).

Na análise de variância foram observadas diferenças estatísticas significantes somente no gene CD137 do grupo concorrente em relação ao grupo resistido (Figura 9A). Verificou-se também um aumento significativo de 830% na expressão de CD137 para o grupo aeróbio, 394% para o grupo resistido e de 1.987% para o grupo concorrente em relação ao grupo de animais sedentários. Ao verificar-se o *d* de Cohen de CD137, para inferência do tamanho de efeito (Figura 9B) observou-se um grande efeito em relação aos grupos aeróbio e concorrente, e um efeito médio em relação ao grupo resistido. Já para os outros genes, TMEM26 e EVA1 do depósito subcutâneo inguinal, não foram observadas diferenças estatísticas para a análise de variância (Figura 9A), embora se observa-se aumentos significativos de 254% no grupo aeróbios, 165% no grupo resistido e 175% no grupo concorrente em relação ao grupo sedentário do gene TMEM26, e aumentos significativos de 227% para os animais do grupo aeróbio, 183% para o grupo resistido e de 218% para o grupo concorrente, em relação ao grupo sedentário para o gene EVA1. Como inferência do tamanho de efeito (Figura 9B), obteve-se para o gene TMEM26 um efeito significativo médio, maior que 0,5, para o grupo aeróbio e um efeito grande, maior que 0,8 para os grupos resistido e concorrente. Para o gene EVA1 foram observados valores significativo pequenos de tamanho de efeito, maior que 0,2, para os grupos aeróbio e concorrente, e um efeito pequeno, menor que -0,2, para o grupo resistido.

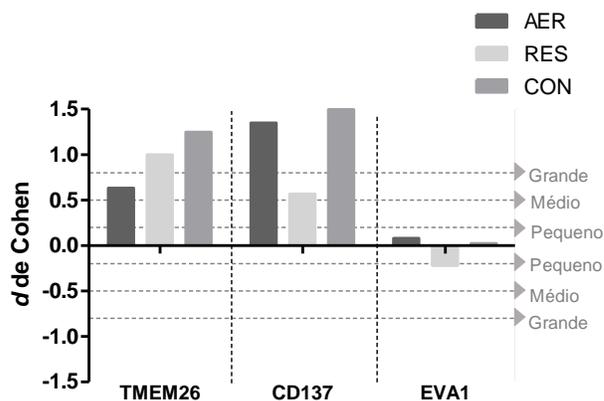
Na figura 9 (C) é apresentada o nível de expressão de RNAm no tecido visceral retroperitoneal para os genes TMEM26, CD137 e EVA1 de animais treinados e sedentários. Na análise de variância não foram observadas diferenças estatísticas significantes. Foi verificado um aumento significativo de 7,3% para o grupo aeróbio, diminuição de -57% para o grupo resistido e de -40% para o grupo concorrente em relação ao grupo sedentário para o RNAm de TMEM26. Houve ainda aumento significativo de 339% para o grupo aeróbio, 557% para o grupo resistido e 54% para o grupo concorrente em relação ao grupo sedentário para o RNAm de CD137. Observa-se também aumentos significativos de 135% para o grupo aeróbio, 206% para o grupo resistido e de 405% para o grupo concorrente em relação ao grupo sedentário para o RNAm de EVA1. Em relação a figura 9 (D), no qual demonstra a inferência do tamanho de efeito, observa-se um pequeno efeito significativo para o grupo aeróbio, um grande

efeito para o grupo resistido e médio efeito para o grupo concorrente para a expressão de RNAm de TMEM26. Há ainda um grande efeito para os grupos aeróbio e resistido e médio efeito para o grupo concorrente em relação ao grupo sedentário para o RNAm de CD137, enquanto que para o RNAm de EVA1 se verifica grande tamanho de efeito para os grupos treinados em relação ao grupo sedentário.

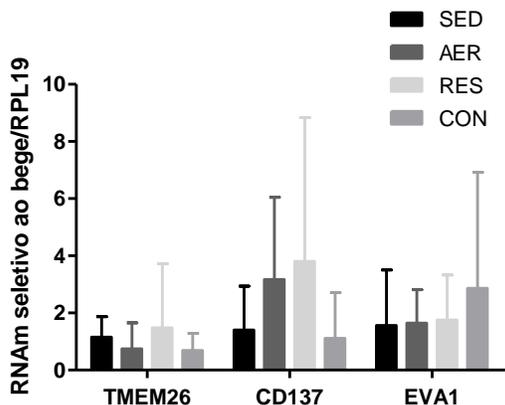
(A) Expressão de RNAm no tecido adiposo subcutâneo inguinal



(B) Tamanho do efeito de RNAm do tecido adiposo subcutâneo inguinal em relação ao grupo SED



(C) Expressão de RNAm no tecido adiposo visceral retroperitoneal



(D) Tamanho do efeito de RNAm no tecido adiposo visceral retroperitoneal em relação ao grupo SED

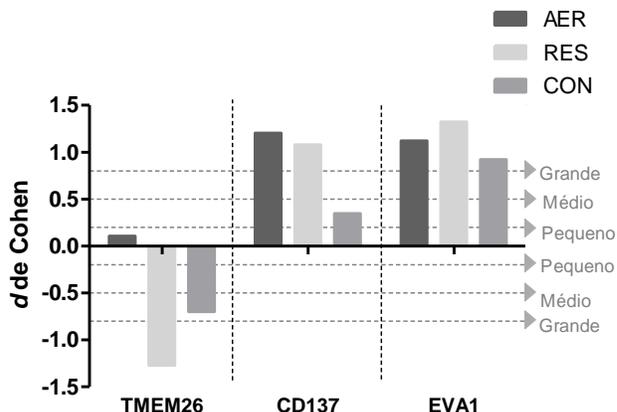
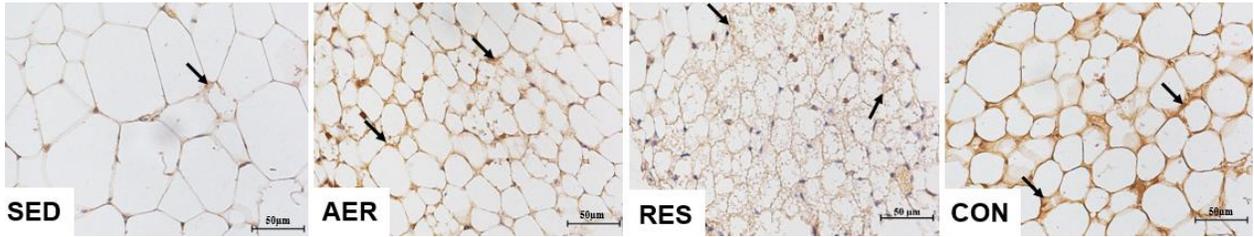


Figura 9. (A) Níveis de expressão de RNAm de TMEM26, CD137 e EVA1 no tecido adiposo inguinal; (B) Tamanho de efeito de RNAm de TMEM26, CD137 e EVA1 no tecido adiposo inguinal; (C) Níveis de expressão de RNAm de TMEM26, CD137 e EVA1 no tecido adiposo retroperitoneal; (D) Tamanho de efeito de RNAm de TMEM26, CD137 e EVA1 no tecido adiposo inguinal; de camundongos de grupos SED= sedentários, AER= aeróbios, RES= resistidos e CON = concorrente. Valores expressos em média \pm desvio padrão, ^Ω p<0,05 em relação ao grupo RES. Tamanho de efeito, sendo considerada pequena quando $\leq 0,2$, média quando $\leq 0,5$ e grande quando $< 0,8$. n=5 por grupo. (n=5 animais/grupo).

A figura 10 (A) é uma fotomicrografia referente a técnica de imunohistoquímica para o antígeno de VEGF no depósito subcutâneo inguinal. A figura 10 (B) é referente a área (μm^2) ocupada da expressão proteica de VEGF de animais que realizaram o treinamento físico e animais sedentário. Na análise de variância foi observado diferença estatística significante de maior área (μm^2) ocupada para os grupos que realizaram o treinamento resistido e concorrente em relação ao grupo sedentário. Verificou-se ainda, aumentos significativos de 89% para animais aeróbios, 118% para animais resistido e 127% para animais concorrente em relação ao grupo de animais sedentários. E para inferência do tamanho de efeito, por d de Cohen (Figura 10 C), observa-se que todos os animais treinados apresentaram um grande efeito significativamente maior, apresentando um grande efeito, com valores acima de 0,8, em relação ao grupo sedentário.

(A) Fotomicrografia da imunohistoquímica de VEGF do tecido adiposo subcutâneo inguinal



(B) Área ocupada por VEGF no tecido adiposo subcutâneo inguinal

(C) Tamanho do efeito de VEGF no tecido adiposo subcutâneo inguinal em relação ao grupo SED.

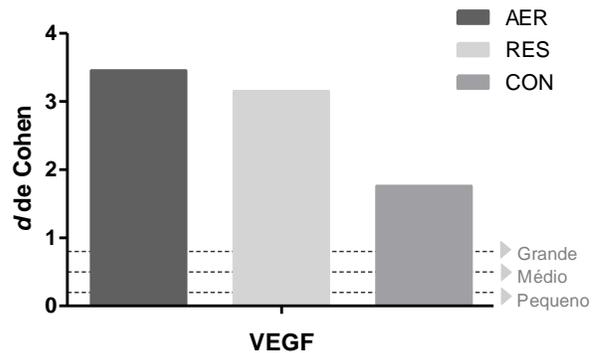
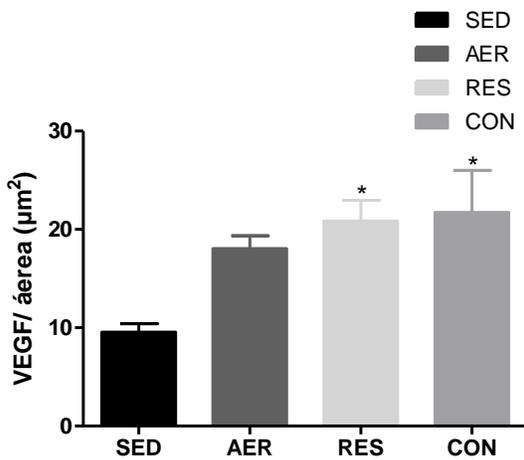


Figura 10. (A) Fotomicrografia da imunohistoquímica de VEGF no tecido adiposo subcutâneo inguinal; (B) Área ocupada por VEGF no tecido adiposo subcutâneo inguinal; (C) Tamanho do efeito da área ocupada por VEGF no tecido adiposo subcutâneo inguinal; dos grupos experimentais SED = sedentário, AER= treinamento aeróbio, RES= treinamento resistido e CON= treinamento concorrente. Valores expressos em média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SED. (n=5 animais/grupo).

6. DISCUSSÃO

Os objetivos deste estudo foram: analisar se os treinamentos físicos aeróbio, resistido e concorrente estimulam o *browning* do tecido adiposo branco, subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal de camundongos machos de linhagem *Swiss* e determinar a expressão proteica de UCP1 e VEGF e a expressão de RNAm de UCP1, TMEM26, EVA1 e CD137. O principal achado foi que os animais submetidos aos treinamentos aeróbio, resistido e concorrente tem uma expressão de proteínas de UCP1 que parece ser tecido dependente decorrente de células originalmente beges, devido a expressão significativamente elevada de genes envolvidos com a origem embrionária dessas células, como o gene observado CD137.

Assim como nossos resultados, que verificam uma maior expressão de UCP1 para o tecido adiposo subcutâneo inguinal, em relação ao tecido adiposo visceral retroperitoneal, estudos vêm demonstrando que esse tecido subcutâneo inguinal parece expressar mais UCP1 do que outros depósitos ao receber determinado estímulo, sendo mais propenso ao *browning*, enquanto os depósitos viscerais demonstram baixo *browning* são considerados depósitos mais clássicos (JONG et al., 2015), em vista dessas considerações, a escolha desses dois tecidos adiposos permitem a sua utilização de maneira representativa para os demais depósitos adiposos do corpo.

Os treinamentos físicos aeróbio, resistido e concorrente podem provocar alterações significativas em diversos parâmetros após um período específico de treinamento (HO, DHALIWAL, HILLS, 2012), embora diversos estudos tendem a utilizar somente o treinamento com exercícios aeróbios para perda de peso (VOTRUBA, HORVITZ, SCHOELLER, 2000). É possível verificar perdas significantes de peso, em humanos, com treinamentos resistido e concorrente, em relação ao treinamento aeróbio (HO, DHALIWAL, HILLS, 2012) e ainda perdas de peso mais significantes do treinamento concorrente, do que somente para exercícios aeróbios e resistidos de modo isolado, em mulheres obesas e normais e em homens, todos sedentários (CHURCH et al., 2010; PARK et al., 2003).

As reduções de pesos corporais geralmente são decorrentes de diminuições dos depósitos de tecido adiposo, pois o exercício estimula a sua reorganização/redução (THOMPSON et al., 2012; XU et al., 2011; COFFEY, HAWLEY, 2007), promovendo efeitos metabólicos benéficos, devido a ativação do sistema nervoso simpático (SANCHES-DELGADO et al., 2015) com isso o exercício físico é capaz de produzir grande mudanças nos tecidos adiposos.

No tecido adiposo marrom, alguns estudos têm reconhecido que o treinamento aeróbio é capaz de aumentar a termogênese desse tecido através do aumento de UCP1 e aumentos do número e do tamanho das mitocôndrias (BOSTRÖM et al., 2012; SLOCOM et al., 2013). Verificamos em nosso estudo que os três tipos de treinamento físico foram eficazes em reduzir as inclusões lipídicas de adipócitos marrons, embora somente os treinamentos resistido e concorrente auxiliaram na diminuição de peso desse depósito. Já nos tecidos adiposos brancos o treinamento resistido e concorrente demonstraram-se eficientes em reduzir parâmetros de peso, em gramas, no tecido inguinal, ademais, para área desse depósito todos os tipos de treinamento foram eficientes reduzir seu tamanho, assim como para o peso do depósito retroperitoneal, embora a área desse depósito só tenha reduzido como efeito do treinamento concorrente.

O treinamento físico de modo geral quando é realizado durante um período de dias e semanas, pode demonstrar efeitos profundos na alteração do tecido adiposo modificando desde a sua morfologia quanto as propriedades bioquímicas, promovendo adaptações específicas para cada depósito (STANFORD, MIDDELBEEK, GOODYEAR, 2015).

Além do mais observamos que estas células adiposas brancas apresentam adipócitos multiloculares, idêntica a morfologia clássica dos adipócitos marrons, ou seja, apresentam maior número de inclusões lipídicas (gotículas), assim como relatado em outros estudos (ZIGUERATTI et al., 2009; COUSIN et al., 1992), que ainda demonstraram que essa mudança morfológica geralmente é acompanhada de aumento do número de mitocôndrias, no qual, conseqüentemente, faz as células se assemelharem mais com adipócitos marrons do que brancos, tanto para humanos quanto para animais.

Encontramos que o depósito de tecido adiposo subcutâneo inguinal é mais estimulado através dos treinamentos aeróbios e resistido, enquanto que para o tecido visceral retroperitoneal as diferenças aparecem principalmente em relação ao grupo de animais que fizeram os treinamentos resistido e concorrente. Portanto, esse é o primeiro estudo que verificou, ao comparar três tipos de treinamento, que independentemente do tecido adiposo, subcutâneo e/ou visceral, o treinamento resistido é mais eficaz em promover aumentos de UCP1, pois estimula essa expressão em ambos depósitos, confirmando a hipótese proposta por este estudo.

Estudos vêm demonstrando que o treinamento aeróbio aumenta a expressão proteica de UCP1 em depósitos viscerais e subcutâneos, além de ser um estímulo promissor, por aumentar o gasto energético dentro do tecido (STANFORD et al., 2015; De MATTEIS et al., 2013), porém, nenhum deles tem estudados a influência dos treinamentos resistido e concorrente sobre a expressão desse gene.

Além do mais, demonstramos aqui que o treinamento concorrente também é eficaz em promover aumentos no tecido adiposo visceral retroperitoneal. Do ponto de vista metabólico o aumento de UCP1, principalmente nesse tecido é de grande importância, pois gorduras viscerais normalmente estão relacionadas com a doenças da síndrome metabólica como por exemplo, intolerância à glicose, hipertensão, dislipidemias e resistência à insulina (CHAU et al., 2014).

As células adiposas que expressam UCP1 tem um potencial termogênico muito maior do que aquelas que não expressam, pois, essa proteína tem a capacidade de transformar a energia em calor dissipado, aumentando o gasto energético do corpo inteiro (LONG et al. 2014; WU, COHEN, SPIEGELMAN, 2013). Aumentos da expressão de UCP1 no tecido adiposo branco não garante qual a origem dos adipócitos (JONG et al., 2015), embora, mesmo após descrições exaustivas sobre os genes específicos para adipócitos marrons e bege *in vivo*, verificou-se que essas células compartilham uma grande gama de expressão gênica, portanto, a expressão de UCP1 indica somente a presença ou ausência de adipócitos beges (LONG et al., 2014), já que expressão de UCP1 pode ocorrer em adipócitos que sofreram uma transdiferenciação, ou ainda de adipócitos originalmente beges, dentro do depósito adiposo branco, portanto, faz-se necessário a identificação de genes específicos para cada uma delas, já que podem

coexistir num mesmo local (WU et al., 2012; LIDELL, BETZ, ENERBACK, 2013; JONG et al., 2015).

Tendo em vista os aumentos de UCP1 encontrados, no tecido adiposo branco nesse estudo, é fundamental verificarmos os genes seletivos a origem embrionária e/ou ao tecido adiposo bege, desse tecido. Os genes TMEM26 e CD137 foram classificados como marcadores fenotípicos específicos para células originalmente beges, enquanto que EVA1 foi classificada como marcador específico para células originalmente marrons. Entretanto, TMEM26 e EVA1 podem ser genes questionáveis por alguns autores, pois de acordo Jong et al., (2015) TMEM26 é imprecisa quanto a células primárias de adipócitos, não apresentando o mesmo padrão de expressão como CD137, servindo apenas como um gene marcador de tecido bege e EVA1 teve sua expressão aumentada somente após uma aclimatação ao frio, correlacionando-se positivamente com a expressão de UCP1, excluindo-a dos genes marcadores de células beges, visto que somente uma correlação com UCP1 não permite a distinção da origem celular.

Outro importante achado do presente estudo foi que a diferença encontrada para genes seletivos ao tecido adiposo bege está relacionada principalmente com o treinamento físico concorrente em relação ao treinamento resistido, já que os animais desse grupo demonstraram aumentos significantes de CD137 no depósito subcutâneo inguinal. Além do mais, também existe diferenças significativas desse gene para os animais submetidos aos treinamentos, pois verificamos aumentos de magnitude para esses grupos em relação ao sedentário, para dos depósitos subcutâneos inguinal e visceral retroperitoneal. Já para o gene TMEM26 é possível observarmos diferenças significativas, de grande magnitude, para o tecido adiposo subcutâneo inguinal e para o gene EVA1 para o tecido adiposo visceral retroperitonea.

A expressão de genes marcadores de origem celular também podem ser mais ou menos afetados de acordo com a origem do estímulo, e isso torna esses marcadores suscetíveis a uma espécie de recrutamento (JONG et al., 2015). Além disso, outros parâmetros como a vascularização do tecido, tipos de células existentes no estroma, composição da matriz extra celular e inervação precisam ser levadas em conta na modulação desses genes marcadores de tipos de adipócitos (ROSENWALD,

WOLFRUM, 2014). Tratando-se da influência do ambiente nos marcadores de genes seletivos ao tecido adiposo bege, foi demonstrado por During et al., (2015) que um ambiente enriquecido, pelo exercício físico, pode estimular a expressão de um fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em depósitos adiposos, antes mesmo da expressão de UCP1, e por isso, auxiliar no processo de *browning* do tecido adiposo branco. Verificamos então, no tecido adiposo subcutâneo inguinal, que animais submetidos aos treinamentos resistido e concorrente exibem maior expressão proteica de VEGF em relação a animais sedentários.

Existem evidências de que a regulação de VEGF pode ocorrer antes mesmo da indução da expressão de UCP1 ou de PGC1 α , sugerindo que o aumento de VEGF seria um estímulo precoce, mas já indicativo do aparecimento de células bege, interferindo nas células precursoras de adipócitos para além de suas funções pró-angiogênicas (SUN et al., 2012). Os aumentos da produção de VEGF são vistos como um efeito protetor contra doenças metabólicas, já que ele foi relacionado com o aumento de macrófagos anti-inflamatórios que evitam a resistência à insulina ou a sua progressão (ELIAS et al., 2012), e por isso o exercício físico resistido e concorrente parecem contribuir de modo mais eficiente em promover benefícios a saúde.

Diante do exposto, conclui-se que os treinamentos estão sendo eficientes em promover não só diferenças morfológicas das células, mas também permite supor que as células originalmente beges têm contribuído para o aumento da expressão de UCP1 por parte desses depósitos adiposos, subcutâneos inguinais e viscerais retroperitoneal.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados no presente estudo conclui-se que:

- a) O treinamento físico resistido promoveu aumentos da expressão proteica de UCP1 em ambos tecidos adiposos branco, subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal;
- b) O tecido adiposo subcutâneo inguinal expressa mais UCP1 do que o tecido adiposo visceral subcutâneo em resposta ao treinamento aeróbio e treinamento resistido;
- c) O treinamento físico concorrente expressa mais RNAm de CD137 do que o treinamento físico resistido;
- d) Os treinamentos físicos, resistido e concorrente promoveram aumentos de VEGF na análise de imunohistoquímica

Sendo assim, pela elevada expressão de UCP1 nos tecidos adiposos subcutâneo inguinal e visceral retroperitoneal promovidas pelos três tipos de treinamento, principalmente pelo treinamento resistido, sugere-se que sejam devido a aumentos do gene CD137 envolvido com a origem embrionária de células adiposas bege. Portanto, recomenda-se para humanos a partir desses experimentos com animais intervenções que se utilizem do treinamento resistido em programas de redução de peso corporal que visem melhoras metabólicas.

REFERÊNCIAS

AHIMA, R.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*. v.14, n. 8, p.229-237, 2006.

American College of Sports Medicine. *Guidelines for Exercise Testing and Prescription*, London: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.

AOKI, M.S., BELMONTE, M.A., SEELANDER, M.C.L. Influência da suplementação lipídica sobre a indução do efeito poupador do glicogênio em ratos submetidos ao exercício físico de “endurance”. *Revista Paulista de Educação Física* 17(2):93-103, 2003.

BANGSBO, J. Performance in sports--With specific emphasis on the effect of intensified training. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. v.25, n.4, p.88-99, 2015.

BOSTRÖM, P.; WU, J.; JEDRYCHOWSKI, M. P.; KORDE, A.; YE, L.; LO, J. C.; RASBACH, K. A.; BOSTROM, E. A.; CHOI, J. H.; LONG, J.Z.; KAJIMURA, S.; ZINGARETTI, M. C.; VIND, B. F.; TU, H.; CINTI, S.; HOJLUND, K.; GYGI, S. P.; SPIEGELMAN, B. M. A PGC1 – α – dependent myokine that drives brown – fat – like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, v.481, n.7382, p. 463 – 468, 2012.

BUCHHEIT, M.; CHIVOT, A.; PAROUTY, J.; MERCIER, D.; AL HADDAD, H.; LAURSEN, P.; AHMAIDI, S. Monitoring endurance running performance using cardiac parasympathetic function. *European Journal of Applied Physiology*. v.108, n.6, p.1153-67. 2010.

CAPUTO, F.; OLIVEIRA, M.; GRECO, C.; DENADAI, B. Exercício aeróbio: aspectos bioenergéticos, ajustes fisiológicos, fadiga e índices de desempenho. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano*. v.11, n.1, p. 94-102, 2009.

CHAU, Y.; BANDIERA, R.; SERRELS, A.; MARTÍNEZ-ESTRADA, O.; QING, W.; LEE, M.; SLIGHT, J.; THORNBURN, A.; McHAFFIE, S.; STIMSON, R.; WALKER, B.; CHAPULI, R.; SCHEDL, A.; HASTIE, N. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nature Cell Biology*. V16, p. 367–375, 2014.

CHURCH, T.; BLAIR, S.; COCREHAM, S.; JOHANNSEN, N.; JOHNSON, W.; KRAMER, K.; MIKUS, C.; MYERS, V.; NAUTA, M.; RODARTE, R.; SPARKS, L.; THOMPSON, A.; ARNEST, C. Effects of aerobic and resistance training on hemoglobin A1c levels in patients with type 2 diabetes. *JAMA*. v. 304, n.20, p. 2253-2262, 2010.

CINTI, S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.* v.297, p.1-10, 2009.

COFFEY, V.; HAWLEY, J. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.* v.37, n.9, p.737-363, 2007.

COFFEY, V.; JEMIOLO, B.; EDGE, J.; GARNHAM, A.; TRAPPE, S.; HAWLEY, J. Effect of consecutive repeated sprint and resistance exercise bouts on acute adaptive responses in human skeletal muscle. *American Physiological Society.* v. 297, n.5, p.R1441-R1451, 2009.

COFFEY, V.; HAWLEY J. The molecular bases of training adaptation. *Sports Medicine.* v.37, n.9, p. 737–763, 2007.

COHADE, C.; MOURTZIKOS, K.; WAHL, RL.; “USA-Fat”: prevalence is related to ambient outdoor temperature-evaluation with 18F-FDG PET/CT. *The Journal of Nuclear Medicine.* v. 44, n.8, p. 1267–1270, 2003.

COHEN, J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences.* Lawrence Erlbaum Associates. 2 ed. Hillsdale, 1998.

COUSIN, S.; CINTI, M.; MORRONI, S.; RAIMBAULT, D.; RICQUIER, L.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *Journal of cell science.* v.103, p. 931–942, 1992.

CYPESS, A. M.; LEHMAN, S.; WILLIAMS, G.; TAL, I.; RODMAN, D.; GOLDFINE, A. B.; KUO, F. C.; PALMER, E. L.; TSENG, Y. H.; DORIA, A.; KOLODNY, G. M.; KAHN, R. C. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *The New England Journal of Medicine,* v.360, n.15, p.1509 – 1517, 2009.

DONNELLY, J.; HILL, J.; JACOBSEN, D.; POTTEIGER, J.; SULLIVAN, D.; JOHNSON, S.; HEELAN, K.; HISE, M.; FENNESSEY, P.; SONKO, B.; SHARP, T.; JAKICIC, J.; BLAIR, S.; TRAN, Z.; MAYO, M.; GIBSON, C.; WASHBURN, R. Effects of a 16-month randomized controlled exercise trial on body weight and composition in young, overweight men and women: the Midwest Exercise Trial. *Archives of internal medicine.* v.163, n.11, p.1343-1350, 2003.

DURING, M.; LIU, X.; HUANG, W.; MAGEE, D.; SLATER, A.; McMURPHY, T.; WANG, C.; CAO, L. Adipose VEGF Links the White-to-Brown Fat Switch With Environmental, Genetic, and Pharmacological Stimuli in Male Mice. *Endocrinology.* v.156, n.6, p. 2059-2-73, 2015.

EGAN, B.; ZIERATH, J. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metabolism.* v.17,n.2, p.162-184, 2013.

ELIAS, I.; FRANCKHAUSER, S.; FERRE, T.; VILA, L.; TAFURO, S.; MUÑOZ, S.; ROCA, C.; RAMOS, D.; PUJOL, A.; RIU, E.; RUBERTE, J.; BOSCH, F. Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *American Diabetes Association*. v. 61, n.7, p.1801-1813, 2012.

FARMER, S. Be cool, lose weight. *Nature*. v. 458, p.1-2, 2009.

FAUL, F.; ERDFELDER, E.; LANG, A.; BUCHNER, A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*. v.39, n.2, p. 175-191, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.; LIMA, F. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. v.50, n.2, 2006.

FONSECA-ALANIZ, M.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.; LIMA, F. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. *Jornal de Pediatria*. v.83, n.5, p. S192-S203, 2007.

FOSCHINI, D.; ARAÚJO, R.; BACURAU, R.; DE PIANO, A.; DE ALMEIDA, S.; CARNIER, J.; ROSA, T.; DE MELLO, M.; TUFIK, S.; DÂMASO, A. Treatment of obese adolescents: the influence of periodization models and ACE genotype. *Obesity*. v.18, n.4, p. 766-772, 2010.

FYFE, J.; BISHOP, D.; STEPTO, N. Interference between concurrent resistance and endurance exercise: molecular bases and the role of individual training variables. *Sports Medicine*. v.44, n.6, p.743-762, 2014.

GENESER, F. *Histologia com bases biomoleculares*. 3ª edição. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2003. p.615.

HAUSMAN, D.; DIGIROLAMO, M.; BARTNESS, T.; HAUSMAN, G.; MARTIN R. The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity*. v.2, p. 239-254, 2001.

HENRY, S.; BENSLEY, J.; WOOD-BRADLEY, R.; CULLEN-McEWEN, L.; BERTRAM, J.; ARMITAGE, J. White adipocytes: More than just fat depots. *The Interna. Jour. Of Biochem. & Cell Biology*. v. 44, p. 435-440, 2012.

HICKSON, R. Interference of strength development by simultaneously training for strength and endurance. *European Journal of Applied Physiology*. v. 45, p. 255-263, 1980.

HILL, D. W.; ROWELL, A. L. Running velocity at VO_{2max} . *Medicine Science Sports and Exercise*. v. 28, n.1, p. 114-119, 1996.

HO, S.; DHALIWAL, S.; HILLS, A.; PAL, S. The effect of 12 weeks of aerobic, resistance or combination exercise training on cardiovascular risk factors in the overweight and obese in a randomized trial. *BMC Public Health*. v.28, n.12, 2012

HO, S.; DHALIWAL, S.; HILLS, A.; PAL, S. The effect of 12 weeks of aerobic, resistance or combination exercise training on cardiovascular risk factors in the overweight and obese in a randomized trial. *BMC Public Health*. v. 12, n.704 p.1-10, 2012.

HORNBERGER, T. A. Jr.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian journal of applied physiology*. v. 29, n. 1, p. 16–31, 2004.

ISHIBASHI, J.; SEALE, P. Beige Can Be Slimming. *Science*. v.328, n.5982, p. 1113-1114, 2010.

IWAMOTO, J.; SHIMAMURA, C.; TAKEDA, T.; ABE, H.; ICHIMURA, S.; SATO, Y.; TOYAMA, Y. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. v. 22, n. 1, p. 26-31, jan. 2004.

JO, J.; GAVRIOLA, O.; PACK, S.; JOU, W.; MULLEN, S.; SUMNER, A.; CUSHMAN, S.; PERIWAL, V. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *Plos Computation Biology*. v.5, n.3, 2009.

JONES, A.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports Medicine*. v.29, n.6, p. 373-386, 2000.

JONG, J.; LARSSON, O.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. v.308, n.12, p. E1085-E1105, 2015.

JUNG, S.; KIM K. Exercise-induced PGC-1 α transcriptional factors in skeletal muscle. *Integrative Medicine Research*. v.3, n.4, p.155-160, 2014.

KIM, H.; LEE, H.; SON, J.; YOON, D. SONG, W. Effect of aerobic training and resistance training on circulating irisin level and their association with change of body composition in overweight/obese adults: a pilot study. *Physiological Research Pre-Press Article*. 2015.

KLAUS, S. Overview: Biological Significance of fat and adipose tissue. In: *Adipose tissue*. Landes Bioscience. Medical Intelligence Unit. p.1-10. Austin: 2001.

KRAEMER, W.; FRAGALA, M. Personalize it: program design in resistance training. *American College of Sport Medicine's Health & Fitness Journal*. v.10, n.7, p.7-17, 2006.

KUIPERS, H.; RIETJENS, G.; VERSTAPPEN, F.; SCHOENMAKERS, H.; HOFMAN, G. Effects of stage duration in incremental running tests on physiological variables. *International Journal of sports medicine*. v.24, n.7, p.486-491, 2003.

LEPPER, C.; FAN, C. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis*. v. 7, n.48, p.424-436, 2010.

LIDELL, M.; BETZ, M.; ENERBACK, S. Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte*. v.3, n.1, p.63-66, 2013.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*. v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LONG, J.; SVENSSON, K.; TSAI, L.; ZENG, X.; ROH, H.; KONG, X.; RAO, R.; LOU, J.; LOKURKAR, I.; BAUR, W.; CASTELLOT, J.; ROSSEN, E.; SPIEGELMAN, B. A Smooth Muscle-Like Origin for Beige Adipocytes. *Cell Metabolism*. v.19, n.5, p.810-820, 2014.

LORENZ, D.; REIMAN, M.; WALKER, J. Periodization: Current Review and Suggested Implementation for Athletic Rehabilitation. *Sports Health*. v.2, n.6, p. 509-518, 2010.

LOWE, C. O'RAHILLY, ROCHFORD, J. Adipogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*. v.124, n.16, 2011.

MACHADO, F.; DE MORAES S.; PESERICO, C.; MEZZAROBA, P.; HIGINO, W. The Dmax is highly related to performance in middle-aged females. *International Journal of Sports Medicine*. v.32, n.9, p. 672-6, 2011.

MACHADO, F.; KRAVCHYCHYN, A.; PESERICO, C.; SILVA, D.; MEZZAROBA, P. Incremental test desing, peak 'aerobic' running speed and endurance performance in runners. *Journal of Science and Medicine in Sport* v.16, p. 577-582, 2013.

MACOTELA, Y.; EMANUELLI, B.; MORI, M.; GESTA, S.; SCHULT, T.; TSENG, Y.; KAHN, C. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes*. v.61, n.7, p. 1691-1699, 2012.

MATOS, L.; TRUFELLI, D.; MATOS, M.; PINHAL, M. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomark Insights*. v.5, p.9-20, 2010.

MATTEIS, R.; LUCERTINI, F.; GUESCINI, M.; POLIDORI, E.; ZEPPA, S.; STOCCHI, V. CINTI, S.; CUPPINI, R. Exercise as a new physiological sitimulus for brown adipose tissue activity. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. v.23, p.582-590, 2013.

MCLAUGHLIN, J.; HOWLEY, E.; BASSETT, D.; THOMPSON, D.; FITZHUGH, E. Test of the Classic Model for Predicting Endurance Running Performance. *Medicine Science of Sports Exercise*. v.42, n.5, p. 991-997, 2010.

MIDGLEY, A.; MCNAUGHTON, L.; JONES, A. Training to enhance the physiological determinants of long-distance running performance: can valid recommendations be given to runners and coaches based on current scientific knowledge? *Sports Medicine*. v.37, n.10, p.857–80, 2007.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *AJP. Endocrinol. Metab.*, v. 293, n.2, p.444 – 452, 2007.

NOAKES, T.; MYBURGH, K.; SHALL, R. Peak treadmill running velocity during the VO₂max test predicts running performance. *Journal of Sports Science*. v.8, n.1, 1990.

OELKRUG, R.; GOETZE, N.; MEYER, C.; JASTROCH, M. Antioxidant properties of UCP1 are evolutionarily conserved in mammals and buffer mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. v.77, p.210 – 216, 2014.

PARK, S.; PARK, J.; KWON, Y.; KIM, H.; YOON, M.; PARK, H. The effect of combined aerobic and resistance exercise training on abdominal fat in obese middle-aged women. *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science*. v.22, n.3, p. 129-135, 2003.

PESERICO, C.; ZAGATTO, A.; MACHADO, F. Reability ok peak running speeds obtained from different incremental treadmill protocols. *Journal of Sport Sciences*. v.32, n.10, p.993-1000, 2014.

POWERS, S.; JACKSON, M. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews*. v.88, n.4, p. 1243-1276, 2008.

RADAK, Z.; ZHAO, Z.; KOLTAI, E.; OHNO, H.; ATALAY, M. Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. v.18, n.10, p.1208-1246, 2013.

RAVUSSIN, E.; GALGANI, J. The implication of Brown Adipose Tissue for Humans. *Rev. Nutri*. v. 31, 2011.

RICHARD, D.; ROFFARELLO, B. M.; CHECHI, K.; LABBÉ, S. M.; TURCOTTE, E. E. Control and physiological determinants of sympathetically mediated brown adipose tissue thermogenesis. *Cellular Endocrinol.*, v.3, n.36, p.01 – 08, 2012.

ROSENWALD, M.; WOLFRUM, C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte*. v.3, p. 4–9, 2014.

SABOURIN, L.; RUDNICKI, M. The molecular regulation of myogenesis. *Clinical Genetics*. v.57, n.1, p.16-25, 2000.

SANCHEZ-GURMACHES, J.; GUERTIN, D. Adipocyte lineages: Tracing back the origins of fat. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1841, p.340-351, 2014.

SCOTT, B.; HOUMARD, J. Peak running velocity is highly related to distance running performance. *International Journal of Sports Science*. v.15, n.8, p. 504-507,1994.

SEALE, P.; BJORK, B.; YANG, W.; KAJIMURA, S.; CHIN, S.; KUANG, S.; SCIME, A.; DEVARAKONDA, S.; CONROE, H.; ERDJUMENT-BROMAGE, H. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. v.454, p.961–967, 2008.

SEALE, P.; KAJIMURA, S.; WENLI, Y.; CHIN, S.; ROHAS, L.; ULDRY, M.; TAVERNIER, G.; LANGIN, D.; SPIELGERMAN, B. Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metabolism*. v.6, v.1, p.38-54, 2007.

SEGAWA, M.; OH-ISHI, S.; KIZAKI, T.; OOKAWARA, T.; SAKURAI, T.; IZAWA, T.; NAGASAWA, J.; KAWADA, T.; FUSHIKI, T.; OHNO, H. Effect of running training on brown adipose tissue activity in rats: a reevaluation. *Research Communications in Molecular Pathology Pharmacology*. v.100, n.1, p. 77-82, 1998.

SHANCHEZ-DELGADO, G.; MARTINEZ-TELLEZ, B.; OLZA, J.; AGUILERA, C.; GIL, A.; RUIZ, J. Role of Exercise in the Activation of Brown Adipose Tissue. *Nutrition & Metabolism*. v.67, n.1, p. 21-32, 2015.

SHIBATA, H.; NAGASAKA, T. The effect of forced running on heat production in brown adipose tissue in rats. *Physiology & Behavior*. v.39, n.3, p.377-80,1987.

SLATTERY et al.,2006

Slattery K, Wallace L, Murphy A, Coutts A. Physiological determinants of three kilometer running performance in experienced triathletes. *J Strength Cond Res*. 2006;20(1):47–52.

SOUZA, K.; VIEIRA, G.; BALDI, M.; GUGLIELMO, L.; LUCAS, R.; DENADAI, B. Variáveis Fisiológicas e Neuromusculares Associadas com a Performance Aeróbia em Corredores de Endurance: Efeitos da Distância da Prova. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. v.17, n.1, p.41-44, 2011.

STANFORD, K.; MIDDELBEEK, R.; GOODYEAR, L. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. *Diabetes*. v. 64, n.7, p. 2361-2368, 2015.

STRATTON, E.; O'BRIEN, B.; HARVEY, J.; BLITVICH, J.; MCNICOL, A.; JANISSEN, D.; PATON, C.; KNEZ, W. Treadmill Velocity Best Predicts 5000-m Run Performance. *International Journal of sports medicine*. v.30, n.1., p.40-45, 2009.

SUGANAMI, T.; TANAKA, M.; OGAWA, Y. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. *Endocrine journal*, v. 59, n. 10, p. 849–57, 2012.

SULLIVAN, G.; FEINN, R. Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. *Journal of graduate medical education*. v.4, n.3, p. 279-282, 2012.

SUN, K.; ASTERHOLM, I.; KUSMINSKI, C.; BUENO, A.; WANG, Z.; POLLARD, J.; BREKKEN, R.; SCHERERA, P. Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction. *PNAS* v.109, n.15, p.5874-5879, 2012.

SUTHERLAND, L.; BOMHOF, M.; CAPOZZI, L., BASARABA, S.; WRIGHT, D. Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue. *The Journal of Physiology*. v.587, p.1607–1617, 2009.

SUTHERLAND, L.; BOMHOF, M.; CAPOZZI, L.; BASARABA, S.; WRIGHT. Exercise and adrenaline increase PGC1 { α } mRNA expression in rat adipose tissue. *The Journal of Physiology*. v.587, p.1607-1617, 2009.

TANG, Q.; LANE, M. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Rev. Biochem*. v.81, n. 21, p.1-22, 2012.

TEWS, D.; WABITSCH, M. Renaissance of Brown Adipose Tissue. *Horm. Res. Paediatr.*, v.75, n. 4, p.231-239,2011.

THOMPSON, D.; KARPE, F.; LAFONTAN, M.; FRAYN, K. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiol.*, v.92, n.1, p.157 – 191, 2012.

TO, M.; AROMATARIS, E.; CASTRO, J.; ROBERTS, M.; BARRIT, G.; RYCHKOV, G. Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated Ca²⁺ current in liver cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v.495, n.2, p. 152-158, 2010.

TRAN, Q.; DOCHERTY, D.; BEHM, D. The effects of varying time under tension and volume load on acute neuromuscular responses. *European Journal of Applied Physiology*. v.98, n.4, p.402-410, 2006.

TSUCHIYA, Y.; ANDO, D.; GOTO, K.; KIUCHI, M.; YAMAKITA, M.; KOYAMA, K. High-Intensity Exercise Causes Greater Irisin Response Compared with Low-Intensity Exercise under Similar Energy Consumption. *Tohoku J. Exp. Med*. v.2, n.233, p.135-140, 2014.

VÁZQUEZ-VELA, M.; TORRES, N.; TOVAR, A. White Adipose Tissue as Endocrine Organ na Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research*. v.39, p.715-728, 2008.

VILLARROYA, F. Irisin, turning up the heat. *Cell Metabolism*. v.15, p.277-278, 2012.

VIJGEN, G.; BOUVY, N.; TEULE, G.; BRANS, B.; HOEKS, J.; SCHRAUWEN, P.; VAN, MARKEN. W. Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism*. v.97, p.E1229-E1233, 2012.

VOSELNAN, M.; HOEKS, J.; BRANS, B.; PALLUBINSKY, H.; NASCIMENTO, E.; VAN DER, L.; BROEDERS, E.; MOTTAGHY, F.; SCHRAUWEN, P.; VAN, M.; LICHTENBELT, W. Low brown adipose tissue activity in endurance-trained compared with lean sedentary men. *International Journal of Obesity*. v.39, n.12, p.1696-1702, 2015.

VOTRUBA, S.; HORVITZ, M.; SCHOELLER, D. The role of exercise in the treatment of obesity. *Nutrition*. v.16, n.3,p.179-188, 2000.

WALTHER, T.; FARESE, J. Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *The Annual Review of Biochemistry*. v.81, p.687-714, 2012.

WHITTLE, A.; RELAT-PARDO, J.; VIDAL-PUIG, A. Pharmacological strategies for targeting BAT thermogenesis. *Cell*. v. 34, n.6, p.347-355, 2013.

WU, H.; KANATOUS, S.; THURMOND, F.; GALHARDO, T.; ISOTANI, E.; BASSELDUBY, R.; SANDERS, W. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*. v.296, n.5566, p.349-352, 2002.

WU, J.; BOSTRÖM, P.; SPARKS, L.; YE, L.; CHOI, J.; GIANG, An.; KHANDEKAR, M.; VIRTANEN, K.; NUUTILA, P.; SCHAART, G.; HUANG, K.; TU, H.; LICHTENBELT, W.; HOEKS, J.; ENERBÄCK, S.; SCHRAUWEN, P.; SPIEGELMAN, B. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell*. v. 150, n.20. 2012.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes & Development*. v.2, p. 1-18, 2013.

WU, M.; BIKOPOULOS, G.; HUNG, S.; CEDDIA, R. Thermogenic Capacity Is Antagonistically Regulated in Classical Brown and White Subcutaneous Fat Depots by High Fat Diet and Endurance Training in Rats. *The Journal of Biological Chemistry*. v.189, n. 49, p.34129 - 34140, 2014.

YONESHIRO, T.; AITA, S.; MATSUSHITA, M.; KAYAHARA, T.; KAMEYA, T.; KAWAI, Y.; IWANAGA, T.; SAITO, M. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *Journal Clinical Investigation*. v.123, p.3404-3408, 2013.

XU, X.; YING, Z.; CAI, M.; XU, Z.; LI, Y.; JIANG, S.Y.; TZAN, K.; WANG, A.; PARTHASARATHY, S.; HE, G.; RAJAGOPALAN, S.; SUN, Q. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*,v. 300,n.05,p.1115–1125, 2011.

ZINGARETTI, M.; CROSTA, F.; VITALI, A.; GUERRIERI, M.; FRONTINI, A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J.; CINTI, S. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *The FASEB Journal*. v. 23, n.9, p.3113-3120, 2009.

ZOUHAL, H.; JACOB, C.; DELAMARCHE, P.; GRATAS-DELAMARCHE, A. Catecholamines and the Effects of Exercise, Training and Gender. *Sport Medicine*. v.38, n. 5, p. 401-423, 2008.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer de Ética de uso de Animais (CEUA-UEM)



Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 8 /5 /2014 Parecer nº 033/2014

Pesquisador: Sidney Barnabé Peres Setor: DFS

Título: Protocolo nº 005/2014

Influência dos treinamentos aeróbio e resistido sobre o "escurecimento" (browning) do tecido adiposo branco.

Entrada: 19/2/2014 Início: 1/4/2014 Término: 1/3/2016

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final:

ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.

Considerações e Parecer:

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM), na sua reunião de 08/05/2014, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM no 032/2006-CEP, vez que não se constatam óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos experimentais nos moldes propostos pelo(a) pesquisador(a).

Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo,
Presidente em exercício do CEAE

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:
I - aprovado;
II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;
III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;
IV - não aprovado

www.ppg.uem.br - e-mail: cee@uem.br