

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

GUSTAVO RENAN GILIO

**PERFIL ADIPOGÊNICO DO TECIDO
ADIPOSO BRANCO DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A DIFERENTES
MODALIDADES DE TREINAMENTO**

Maringá

2016

GUSTAVO RENAN GILIO

**PERFIL ADIPOGÊNICO DO TECIDO
ADIPOSO BRANCO DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A DIFERENTES
MODALIDADES DE TREINAMENTO**

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)

Gilio, Gustavo Renan

G474p Perfil adipogênico do tecido adiposo branco de camundongos submetidos a diferentes modalidades de treinamento / Gustavo Renan Gilio. - Maringá, 2016.
59 f.: Il. Color. Graf.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) -
Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Educação Física, Programa de Pós-graduação Associado em Educação Física UEM/UEL.

1. Fisiologia do Tecido adiposo. 2. Adipogênese.
3. Treinamento aeróbico. 4. Treinamento resistido.
5. Treinamento combinado. I. Peres, Sidney
Barnabé, orient. II. Universidade Estadual de Maringá,
Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Educação Física,
Programa de Pós-graduação Associado em Educação Física UEM/UEL. III. Título.

612.028
796.01
21.ed.

Cicilia Conceição de Maria
CR9 1066
AHS-001806

GUSTAVO RENAN GILIO

**PERFIL ADIPOGÊNICO DO TECIDO
ADIPOSO BRANCO DE CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A DIFERENTES
MODALIDADES DE TREINAMENTO**

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

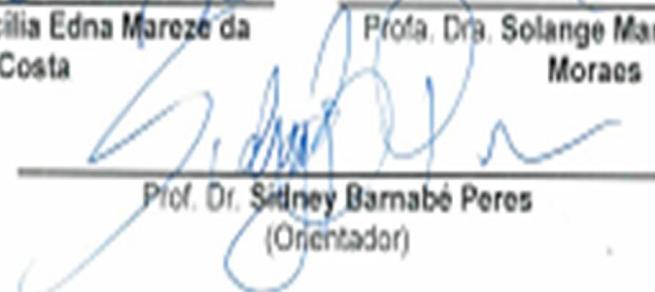
APROVADA em 27 de abril de 2016.



Profa. Dra. Cecilia Edna Mareze da
Costa



Profa. Dra. Solange Marta Franzói de
Moraes



Prof. Dr. Sidney Barnabé Peres
(Orientador)

GILIO, Gustavo Renan. **Perfil adipogênico do tecido adiposo branco de camundongos submetidos a diferentes modalidades de treinamento**. 2016. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Maringá, 2016.

RESUMO

O tecido adiposo branco é um órgão metabólico com ampla plasticidade. Os adipócitos conseguem armazenar grande volume lipídico de triacilglicerol e sua gênese é sensível a fatores externos como o exercício físico. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência de diferentes modalidades de exercício na estrutura do tecido adiposo e os fatores que caracterizam a adipogênese, sobretudo considerando-se a heterogeneidade dos diferentes depósitos de gordura. Portanto, o objetivo do trabalho foi determinar o perfil adipogênico do tecido adiposo branco de camundongos submetidos a diferentes modalidades de treinamento. Para o protocolo experimental foram utilizados 80 camundongos da linhagem *Swiss* machos divididos em 4 grupos: sedentário (SED - controle) (n=20) e os treinados: aeróbio – esteira (AER) (n=21), resistido – escada (RES) (n=19) e combinado (COM – aeróbico e resistido) (n=20), água e ração *ad libitum* e treinamento físico foi realizado 5x por semana, durante 8 semanas. Ao final do protocolo experimental, o peso corporal e comprimento naso-anal (CNA) (para estimação do Índice de Lee) dos animais foram aferidos, o coxim adiposo RET – retroperitoneal, MÊS – mesentérico e EPI – periepídidimo (viscerais), e ING – inguinal (subcutâneo) foram coletados e pesados. Para análise histológica os coxins RET, EPI e ING foram fixados em parafina, cortados e corados com hematoxilina e eosina para medir a área dos adipócitos dos coxins. Para análise da expressão gênica o RNA total dos coxins RET e ING foi extraído, amplificado e quantificado pelo método de PCR em tempo real para os genes PPAR γ , C/EBP α , Pref1 e Perilipina. A normalidade dos dados foi conferida; os testes ANOVA one-way (pós teste de tukey) e Kruskal Wallis (pós teste de Dunns) foram utilizados para calcular a magnitude de diferença entre os grupos, adotando-se o $P < 0,05$. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média. Além da estatística convencional, o tamanho de efeito por d de Cohen foi utilizado, onde valores $> 0,8$ ou $< -0,8$ foram tidos como efeito “grande” comparados a linha de base (valores relativos ao grupo SED). Os resultados apontam que: o grupo RES foi o único que apresentou menor peso corporal; AER, RES e COM menor peso nos coxins viscerais e RES e COM menor peso no coxim ING, todos comparados ao grupo SED. Não houve diferença estatística para área de adipócitos entre os grupos. No entanto, os grupos RES e COM apresentaram tamanho de efeito grande ($< -0,8$) para a área dos adipócitos em relação ao grupo SED em RET, EPI e ING enquanto o grupo AER apenas nos coxins EPI e ING ($< -0,8$). Para as expressões gênicas (RNAm), Não houve diferença estatística de qualquer RNAm para o grupo AER, nem para qualquer grupo no coxim RET, porém o grupo RES apresentou menor expressão de PPAR γ e o grupo COM menor expressão de C/EBP α e perilipina, comparados com o grupo SED para coxim ING. Já para o tamanho de efeito da expressão gênica, os grupos RES e COM apresentaram tamanho de efeito grande para C/EBP α ($> 0,8$) e o grupo AER para o gene Pref1 ($< -0,8$). Os grupos RES e COM também tiveram tamanho de efeito grande para a expressão de PPAR γ , C/EBP α e Perilipina ($< -0,8$) no coxim ING. A partir dos resultados podemos observar o treinamento resistido e combinado tiveram maior destaque porque puderam diminuir o peso dos coxins viscerais e o subcutâneo. O treinamento combinado parece ser a melhor opção para reduzir fatores adipogênicos (a partir das menores expressões gênicas de C/EBP α e Perilipina), assim como o treinamento resistido isoladamente para menor expressão de PPAR γ , ambos no coxim inguinal (subcutâneo). Desta forma, podemos concluir que o tipo de exercício bem como o coxim parecem influenciar nos padrões de adaptações analisados. De qualquer forma, o treinamento físico resistido e combinado é um estímulo eficiente na modulação da adipogênese *in vivo*.

Palavras-chave: tecido adiposo, adipogênese e treinamento físico.

GILIO, Gustavo Renan. **White adipose tissue adipogenic profile of mice submitted to different training modalities.** 2016. Dissertation (Physical Education Master) – Health Science Center. Maringá State University, Maringá, 2016.

ABSTRACT

The white adipose tissue is a metabolic organ with wide plasticity. The adipocyte stores a great lipid volume of triglycerides being adipogenesis sensitive to external factors such as physical exercise. In addition, exercise modulation of adipogenesis is poorly understood when comes to influence of different exercise types. Therefore, the aim of this study was to determine the adipogenic profile of different white adipose tissue depots of mice submitted to different training modalities. The experimental protocol was conducted using 80 male swiss mice, 45 days old, grouped as follow: sedentary control (SED) (n=20), aerobic training – treadmill (AER) (n=21), resistance training – ladder (RES) (n=19) and combined training (COM – aerobic and resistance) (n=20). Animals had free access to water and food. Physical training was realized 5x/week, throughout 8 weeks. After the end of experimental protocol, the animals body weight and naso-anal length (Lee's index) were determined, RET, MES, EPI, e ING were collected and weighed, the RET, EPI e ING fat pad were fixed in paraformaldehyde, embbed in paraffin, cut and stained in hematoxylin and eosin to measure adipocyte area. The RET e ING fat pad total RNA were extracted, amplified and quantified by real time PCR in order to determine PPAR γ , C/EBP α , Pref1 e Perilipin mRNA expression. The data normalities were determined, ANOVA one-way test (Tukey post-hoc) and Kruskal Wallis (Dunns post-hoc) were used to calculate the different magnitude among the groups, adopting P<0,05. The results were provided as mean and mean standard error. Moreover, size effect by Cohen'd was used, being values >0.8 or <-0.8 considered as "great size effect". The results show that: the RES group was the only one who had lower body weight; AER, RES and COM lower weight in visceral fat pad and RES and COM lower weight on the ING fat pad, all of them compared to the SED group. There was no statistical difference for adipocytes area among the groups. However, the RES and groups showed large effect size (<-0.8) to the area of adipocytes compared to the SED group in RET, EPI and ING whilst the AER group only in EPI and ING fat pad (<-0.8). For gene expression (mRNA), There was no statistical difference in any mRNA for the AER group or to any group in the RET fat pad, but the RES group showed lower expression of PPAR γ and COM group lower expression of C/EBP α and perilipin, both compared to the SED group to ING fat pad. At the effect size of gene expression, the RES and COM groups showed large effect size for C/EBP α (> 0.8) and the AER group for Pref1 mRNA (<-0.8). The RES and COM groups also had large effect size for the expression of PPAR γ , C/EBP α and perilipin mRNA (<-0.8) in ING fat pad. From the results we can see the resistance and combined training stood out because they could reduce the weight of visceral and subcutaneous cushions. The combined training seems to be the best option to reduce adipogenic factors (from the smaller gene expression of C / EBP α and perilipin), as well as the isolation resistance training to lower expression of PPAR γ , both in the inguinal fat pad (subcutaneous). Thus, we can conclude that the type of training and the fat pad seem to influence the patterns of analyzed adaptations. In summary, resistance and combined exercise training is a powerful stimulus for modulating adipogenesis in vivo.

Key-words: adipose tissue, adipogenesis, physical training.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer meus pais por me apoiarem nesses últimos dois anos em que estive no mestrado, oferecendo todo o suporte familiar e conforto do lar, embora eu tenha estado ausente em várias reuniões familiares o que os deixou tristes. A eles, serei sempre, incondicionalmente grato.

A Caroline Picoli que esteve comigo desde nosso ingresso no mestrado, pela grande parceria em momentos tanto dentro quanto fora do ambiente de pesquisa, compartilhando alegrias e tristezas, crescemos muito nesses últimos dois anos.

Aos companheiros de laboratório Gisele, Debora, Rafael, Sérgio, Bruno, Paulo Vitor, Jean, Cecília, Francisco e Danilo, Laíze pelo apoio em laboratório e discussões acerca do meu trabalho.

Aos laboratórios Labita da Universidade de Mogi das Cruzes – SP, pelo suporte nas análises de expressão gênica e todo os envolvidos: Felipe Henriques, Luana, Felipe Franco, Magno, Kaltinaitis, Priscila e o prof. Miguel Batista. E o Laboratório de biologia celular da secreção da UEM do prof. Paulo Mathias e a aluna Laize Peron por ceder espaço em seu laboratório para o uso de equipamentos.

As técnicas Elizete, Valéria e Marcia, Maria Angela, Maria dos Anjos e Eurides e Marta pela total atenção nos laboratórios em momentos profissionais e descontraídos.

Aos Professores, Montserrat, Rosangela, Célia, Luzmarina, Solange, pelo apoio acadêmico, colaborando com meu conhecimento acerca da fisiologia.

Ao meu orientador Prof. Sidney Barnabé Peres, que sempre confiou em mim, e me acompanhou em todas as etapas de desenvolvimento da minha pesquisa. Direcionando-me. Obrigado pela paciência, sabedoria e alegria.

Aos demais aqui não citados, que contribuíram de alguma outra forma tanto dentro quanto fora da pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos principais tecidos adiposos Branco e Marrom adaptado de Tran; Kahn, (2010).....	17
Figura 2. Esquema da diminuição do adipócito e expressão de citocinas pelos tipos de exercício físico: Resistido (com pesos) x Endurance (corrida). WAT – Tecido adiposo branco; MCP-1 – Proteínas quimiotáticas de monócitos 1; IL-6 – interleucina 6 (SAKURAI et al., 2013).....	24
Figura 3. A – Teste incremental para determinação da Vpico para os grupos SED, AER e COM. B – Teste de força máxima em escada para os grupos SED, RES e COM.....	32
Figura 4. A – Area de adipócito em μm^2 dos coxins adiposos RET – retroperitoneal, EPI – epididimal e ING – inguinal dos grupos SED, AER, RES e COM. B – tamanho de efeito da área de adipócitos dos coxins adiposos RET – retroperitoneal, EPI – epididimal e ING – inguinal dos grupos AER, RES e COM em relação a linha de base (grupo SED).....	34
Figura 5. fotografia de cortes histológicos da morfologia do tecido adiposo branco dos grupos SED, AER, RES e COM para os coxins: RET – retroperitoneal, EPI – periepididimal e ING – inguinal. Escala em $50\mu\text{m}^2$	35
Figura 6. – Expressão gênica (qPCR) de PPAR γ (A) relativos ao gene RPL19 dos tecidos adiposos RET – retroperitoneal e ING – inguinal dos diferentes grupos SED, AER, RES e COM (n=4-5). Tamanho de efeito do treinamento RET, AER e COM relativizados ao grupo SED (linha de base) para o gene PPAR γ (B).....	36
Figura 7. – Expressão gênica (qPCR) de C/EBP α (A) relativos ao gene RPL19 dos tecidos adiposos RET – retroperitoneal e ING – inguinal dos diferentes grupos SED, AER, RES e COM (n=4-5). Tamanho de efeito do treinamento RET, AER e COM relativizados ao grupo SED (linha de base) para o gene C/EBP α (B).....	37
Figura 8. – Expressão gênica (qPCR) pref1 (A) relativos ao gene RPL19 dos tecidos adiposos RET – retroperitoneal e ING – inguinal dos diferentes grupos SED, AER, RES e COM (n=4-5). Tamanho de efeito do treinamento RET, AER e COM relativizados ao grupo SED (linha de base) para os genes de pref1 (B).....	38
Figura 9. – Expressão gênica (qPCR) Perilipina (A) relativos ao gene RPL19 dos tecidos adiposos RET – retroperitoneal e ING – inguinal dos diferentes grupos SED, AER, RES e COM (n=4-5). Tamanho de efeito do treinamento RET, AER e COM relativizados ao grupo SED (linha de base) para os genes de Perilipina (B).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema dos treinamentos de corrida e escalada do grupo “Combinado” de duas semanas seguindo dessa forma até completar 8 semanas. TC – treinamento combinado. #dia do teste incremental na esteira (aeróbico); *Teste incremental na escada (anaeróbio).....	29
Tabela 2. Peso corporal do animal(g), delta de peso(g), Índice de Lee e peso dos coxins(g).....	33
Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos comparados ao grupo SED.....	48
Tabela 4. Resumo do tamanho de efeito dos resultados obtidos comparados ao grupo SED.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC	Carboxilase de acetil Coenzima A
AER	Grupo aeróbico
ALBP	Proteína de ligação de lipídeos em adipócitos
ATGL	Lipase de triacilglicerol em adipócitos
BMP	Proteína morfogenética
CEBP	Proteína de ligação intensificadora de CCAAT
CNA	Comprimento naso-anal
CM	Carga máxima
COM	Grupo combinado
CTM	Células tronco mesenquimais
ECM	Expansão Clonal Mitótica
EPI	Coxim adiposo periepidimal
FABP4	Proteína de ligação de ácidos graxos 4
FAS	Ácido graxo sintetase
FSV	Fração do estromal vascular
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GSK3β	Glicogênio sintetase quinase 3 beta
HSL	Lipase Hormônio-sensível
IBMX	Isobutilmetilxantina
ING	Coxim adiposo inguinal
IGF1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
LPL	Lipase de lipoproteína
MES	Coxim adiposo mesentérico
PGC1α	Peroxissoma activado pelo proliferador do receptor gama coactivador-1 alfa
PPARγ	Proteína proliferadora de peroxissomas
Pref-1	Fator de transcrição determinante de adipócito 1
RES	Grupo resistido
RET	Coxim adiposo retroperitoneal
SED	Grupo sedentário
SREBP1	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
UCP1	Proteína desacopladora de protons 1
Wnt	Proteína codificadora do gene wnt
1RM	Uma repetição máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVO.....	14
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
4.1. Distribuição do tecido adiposo no corpo.....	15
4.2. Os “adipócitos brancos e marrons”.....	17
4.3. Adipogênese.....	19
4.3.1. Comprometimento.....	19
4.3.2. Diferenciação.....	20
4.4. Exercício e Adipogênese.....	22
5. METODOLOGIA.....	26
5.1. Animais.....	26
5.2. Procedimento Experimental.....	26
5.3. Protocolo de treinamento físico.....	26
5.3.1. Treinamento físico aeróbico.....	26
5.3.2. Treinamento físico resistido.....	27
5.3.3. Treinamento físico combinado.....	29
5.4. Coleta dos tecidos.....	29
5.5. Histologia do tecido adiposo branco.....	30
5.7 Expressão gênica RT-PCR.....	30
5.8 Análise estatística.....	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1. Teste incremental final.....	32
6.2. Peso corporal e peso dos coxins viscerais e inguinal.....	33
6.3. Área de adipócitos.....	35
6.4. Expressão gênica.....	36
6.4.1. PPAR γ	36
6.4.2. C/EBP α	37
6.4.3. Pref1.....	38
6.4.4. Perilipina.....	39
7. DISCUSSÃO.....	41
7.1. Treinamento Físico.....	41
7.2. Peso Corporal.....	42
7.3. Adiposidade (peso dos coxins e área de adipócitos).....	43
7.4. Expressão gênica de marcadores característicos da adipogênese.....	44
8. CONCLUSÃO.....	50
ANEXOS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Após 40 anos de registros de índice de massa corporal pelo mundo em nenhum momento o quadro de obesidade deixou de se tornar problema de saúde pública. Segundo o jornal The Lancet (2016), caso as tendências corresponderem aos registros obtidos, em meio século (1975-2025) a obesidade irá atingir 19% dos homens e 21% das mulheres da população mundial. O excesso de peso é caracterizado pelo aumento descontrolado do tecido adiposo que perde seu equilíbrio funcional associando-se a evolução de várias outras doenças como diabetes melitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (HAJER et al., 2008).

Apesar de existirem duas formas definidas de tecido adiposo, o marrom (TAM), com propriedades termogênicas, e o branco (TAB), grande estocador de lipídeos, são as células do TAB que são programadas a armazenar energia na forma de triacilglicerol, apresentando assim grande expansão do tecido adiposo (hipertrofia), associado a capacidade adipogênica (hiperplasia), ambas relacionadas com o processo anabólico contínuo onde o estilo de vida sedentário pode se tornar sua maior causa (GONZÁLEZ-GROSS; MELÉNDEZ, 2013). Isso ocorre porque há uma constante e entrada e saída de triacilglicerol nos adipócitos que ocorrem para suprir a demanda de substrato energético dos outros tecidos como o muscular (HALL, VAN, 2015). Todas essas alterações são possíveis devido a adipogênese do TAB ocorrer de forma constante sendo que as funções estruturais e funcionais do tecido estão sempre relacionadas a atividade transcricional de fatores pró-adipogênicos chaves como PPAR γ e C/EBP α na célula comprometida a se tornar adipócito, concomitante com a ativação de outras cascatas transcricionais que são responsáveis pelas características fenotípicas relacionadas ao controle metabólico do adipócito (WU et al., 2012).

O exercício físico tem sido uma ótima ferramenta para melhorar o perfil metabólico do tecido adiposo, principalmente o treinamento aeróbico que apresenta protocolos mais controlados de testes para identificar a melhor intensidade correspondente para obter altas taxas de oxidação lipídica para produção energética (ACHTEN; JEUKENDRUP, 2004) além de reduzir da adiposidade visceral

(VISSERS, et al. 2013),embora o treinamento resistido ocasione alterações estruturais relevantes no tecido adiposo (STRASSER et al. 2010) .

Atualmente a combinação entre os exercícios aeróbicos e resistidos tem sido muito utilizada nos programas de treinamento onde vários benefícios ao metabolismo lipídico podem ser conferidos, sendo ele realizado em esteira com intensidades superiores a 70% do VO_{2max} (MONTEIRO et al., 2015)ou uso de sobrecargas com testes aferidos em 80% 1RM (80% do teste de força máxima em uma única repetição)(BALDUCCI et al., 2010).

Apesar desses trabalhos apresentarem melhora no perfil lipídico e redução do TAB não foi encontrado na literatura trabalhos que caracterizarem os marcadores adipogênicos no tecido adiposo branco em modelos de comparação entre os treinamento aeróbico, resistido e combinado.

2 JUSTIFICATIVA

O tecido adiposo branco desempenha papel essencial no controle do metabolismo energético atuando não somente como um reservatório de gordura, mas também um órgão endócrino, sendo o exercício um agente mediador no equilíbrio estrutural e funcional deste tecido.

Por outro lado, pouco se conhece se estrutura e função do TAB são modificadas de maneira similar por tipos de treinamento distintos, como o aeróbio, resistido e combinado e, em nível mais aprofundado, se marcadores moleculares ligados a formação (adipogênese) do tecido adiposo branco também são afetados. Além disso, cada depósito de TAB apresenta particularidades funcionais, podendo o exercício afetá-los de forma peculiar.

Nossa hipótese é de que esta distribuição e a adipogênese possam ser afetadas de maneira específica a cada tipo de treinamento.

3 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil adipogênico do tecido adiposo branco de camundongos *Swiss* submetidos a diferentes modalidades de treinamento.

2.2 Objetivo Específico

1. Determinar o peso dos tecidos adiposos e a área dos adipócitos, ambos dos coxins: viscerais (retroperitoneal, mesentérico e periepididimal) e subcutâneo (inguinal) entre os diferentes grupos;
2. Determinar a expressão gênica dos marcadores adipogênicos PPAR γ , C/EBP α , Pref1 e Perilipina nos tecidos adiposos retroperitoneal e inguinal entre os diferentes grupos;

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Distribuição do tecido adiposo no corpo

O tecido adiposo (TA) tem a capacidade de se desenvolver em várias regiões do corpo, com áreas de maior acúmulo. A proporção estimada de tecido adiposo para um adulto eutrófico é em torno de 20% do peso corporal total sendo que há uma variabilidade relacionada ao sexo, em que as mulheres apresentam maiores taxas de massa adiposa comparada aos homens (CHUDECKA et al., 2014); com o envelhecimento há uma tendência no aumento desta porcentagem para ambos os sexos (GALLAGHER et al., 2000). Alguns dados sugerem que diferenças étnicas/raciais apresentariam também índices de massas corporais distintas (SWINBURN et al., 2011). Essa variabilidade na composição corporal, principalmente no que se refere ao tecido adiposo, ocorre porque além de se alojar em vários seguimentos corporais, ele tem a capacidade de armazenamento e plasticidade discrepantes em valores correspondentes de 5% a 60% do peso corporal de um humano (WALKER et al., 2014).

A variabilidade de gordura no corpo é caracteristicamente diferente do homem para mulher. Durante os primeiros anos de vida, meninas apresentam percentual de gordura ligeiramente maior comparado aos meninos. Ao atingir a puberdade, as garotas tendem a aumentar a massa adiposa ao passo que os garotos aumentam a massa muscular e acumulam TA branco (TAB) no compartimento interno da cavidade abdominal (WELLS, 2007). Homens adultos tendem a apresentar maior quantidade de gordura na região visceral, enquanto mulheres na região subcutânea, principalmente na região do abdômen até o quadril, classificando-os de biótipos andróide e ginóide, respectivamente (ASHWELL et al., 1978). Apesar da proporção de TAB diferente entre os sexos existir, ambos seguem basicamente com a mesma estrutura, podendo ser classificados, a partir de sua regionalidade: Na região subcutânea da pele, (TAB subcutâneo - abaixo da camada dermal), além da gordura que está na região glútea, femural e abdominal; na cavidade interna abdominal e torácica (TAB visceral) está distribuído em vários compartimentos: o coxim retroperitoneal (região lateral ao corpo entre a pleura peritoneal e a parede do omento). Logo abaixo do peritônio, há uma a camada do coxim omental, sobre o

intestino; o coxim mesentérico, percorrendo por toda a parede do intestino; e nos coxins periepididimal (homens) ou útero-ovariano (mulheres), depósitos que se localizam próximos as regiões do aparelho reprodutor (SMITH et al., 2001).

Os diferentes depósitos de TAB distribuem-se por praticamente toda a área corporal, porém é possível que haja acúmulo ectópico de gordura no músculo, fígado e pâncreas (SUGANAMI et al., 2012). Normalmente, esta distribuição incomum pode ser decorrente de doenças metabólicas, hormonais, síndrome genéticas ou até mesmo por uso de medicamentos de forma contínua. Dentre as doenças ou síndromes metabólicas que ocasionam disfunções no TAB em regiões específicas do corpo, tem-se a Obesidade e doenças correlatas que caracterizam a síndrome metabólica (GUSTAFSON et al., 2015) e outras pouco comuns como: o Hipogonadismo e síndrome de Cushing que resultam em acúmulo de depósito adiposo elevado em áreas específicas do corpo. Diferente do que acontece com pacientes vivendo com a HIV (BEHRENS et al., 2005) que fazem uso do tratamento antirretroviral e dos pacientes com caquexia (PETRUZZELLI et al., 2014; BATISTA et al., 2016), que apresentam redistribuição anormal e lipodistrófica de TA pelo corpo; por fim, síndromes genéticas (falha cromossômica) como de Klinefelter, Turner e Hiperandrogenismo ovariano que ocasionam acúmulo diferenciado de gordura devido a falha de secreção de hormônios gonadais e consequente alteração das características sexuais (WELLS, 2007) Há vários mecanismos que explicam a distribuição de tecido adiposo no corpo humano, embora muitos ainda não concisos.

É possível ilustrar a distribuição do tecido adiposo em modelo murino com objetivo de compreender a distinção e características dos diferentes coxins adiposos (TRAN; KAHN, 2010), contribuindo com pesquisas na área, como ilustra a figura 1.

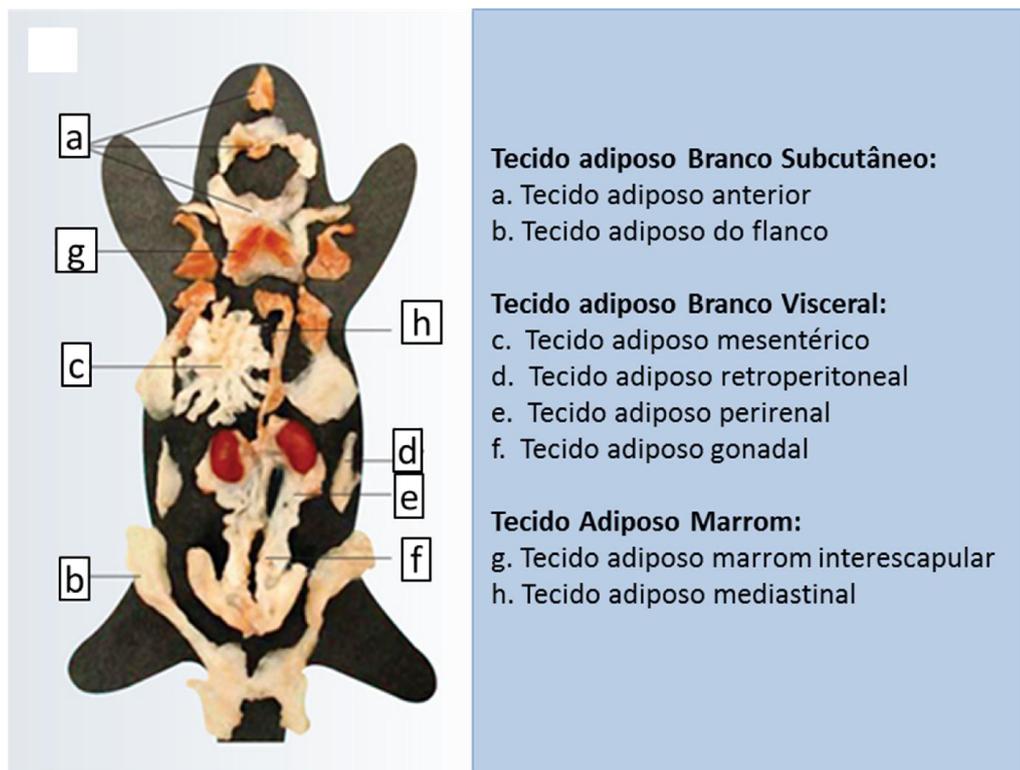


Figura 1. Distribuição dos principais tecidos adiposos Branco e Marrom adaptado de Tran; Kahn, (2010).

O modelo murino apresenta o tecido adiposo branco e marrom muito similar ao humano, embora o tecido adiposo marrom seja proporcionalmente maior em camundongos. A imagem apresenta, assim como sua coloração, uma forma didática de compreender as características desses coxins adiposos. Do centro para a periferia: os depósitos viscerais que são mais “brancos” e estocadores de triacilglicerol; aqueles da região torácica com características mistas apesar de estocarem lipídios estão próximos do tecido cardíaco com grande atividade metabólica; os coxins subcutâneos brancos e então alguns coxins se apresentam como “marrons” sendo um na cavidade torácica (mediastinal) e o outro na região posterior (interescapular).

4.2. Os “adipócitos brancos e marrons”.

Os componentes que integram o Tecido Adiposo e que podem ser extraídos a partir da fracção do estroma vascular (FSV) do tecido são: células endoteliais, células estaminais multipotentes, células do sistema imune (macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células-T), fibroblastos e adipoblastos, que são pré-adipócitos (células

comprometidas a se tornarem adipócitos) e, por fim, os adipócitos, a principal célula do tecido; (BAKKER et al., 2004). A distribuição desses componentes teciduais se difere principalmente pelo tipo de tecido adiposo. Atualmente, temos caracterizado tanto no corpo humano quanto no modelo murino o tecido adiposo Branco, Marrom, Tecido Adiposo “Bege” (características termogênicas encontradas no TAM)(WU et al., 2012), e o último caracterizado apenas em humanos como “Rosa”, presente na região mamária em mulheres(GIORDANO et al., 2014).

Os adipócitos são as principais células do tecido adiposo e são funcionalmente diferentes entre o TAB e o TAM. Os adipócitos do TAM possuem várias gotículas de gordura tamanhos diferentes em seu interior sendo, portanto, multiloculares. Eles são especializados em utilizar o estoque lipídico em seu interior para a produção de calor. Possuem grande quantidade da proteína desacopladora de prótons 1 - UCP1, que proporciona a entrada de prótons para a matriz mitocondrial, desacoplando a síntese de ATP e gerando calor que é irradiado para os capilares e corrente sanguínea (BRONDANI et al., 2012). Já os adipócitos do TAB são células uniloculares que compreendem uma única gota de lipídio que ocupa praticamente todo interior celular, afastando o citoplasma e núcleo que estão em torno dela para junto à membrana. O TAB é considerado o maior estocador energético do corpo em forma de gota lipídica, composta de triglicerídeos (três moléculas de ácidos graxos ligado a uma molécula de glicerol) que são transferidos para interior das células pela ação da Lipase de Lipoproteína (LPL) (KERSTEN, 2014). Por muito tempo o TAB foi considerado apenas um depósito de armazenamento de gordura, porém a vitalidade desse tecido é crucial não somente à homeostase energética, mas também ao balanço endócrino do organismo.

O processo de distribuição do tecido adiposo, o seu desenvolvimento e suas funções além das demais características dependem de complexas redes de sinalizações intracelulares que orquestram a produção de proteínas responsáveis em manter as funções do tecido adiposo em estado harmonioso (MANTEIGA et al., 2013). O estudo da adipogênese pode ajudar a compreender melhor o comportamento do tecido adiposo.

4.3. Adipogênese

O processo de adipogênese é bem descrito em laboratório com o uso de em cultura de células. Inicialmente as células troncomesenquimais passam pelo processo de “comprometimento” e após estarem marcadas a se tornarem adipócitos, entram de fato para o processo de adipogênese ou “diferenciação”(TANG; LANE, 2012). Os dois processos, comprometimento e diferenciação são detalhadas a seguir.

4.3.1. Comprometimento

Os adipócitos são originados de células tronco mesenquimais, que podem se comprometer com estímulos locais (*in vivo*) ou químicos (*in vitro*) adequados. A passagem de um estado pré-adipocitário para uma célula adiposa é conhecido como adipogênese. Os primeiros estudos sugerindo o fenômeno adipogênico partiram de ensaios realizados em 1973 no laboratório de Charles Heidelberger da Universidade de Wisconsin, Estados Unidos. Em seu trabalho, células embrionárias de camundongos Swiss “CH3” foram mantidas em cultura até que se identificou uma linhagem que resistiu ao meio por vários ciclos e que pudesse se diferenciar em células do tecido adiposo, muscular, cartilaginoso e ósseo que, sendo definidas de “imortalizadas” e chamadas de “CH310T1/2” e que passaram a ser reproduzidas (REZNIKOFF et al., 1973). Desde então estas células tronco mesenquimais (CTM) multipotentes, tem sido utilizadas para estudar o programa de desenvolvimento dos adipócitos/tecido adiposo *in vitro*. O início do programa adipogênico é marcado pelo comprometimento de CTM para pré-adipócitos, fenômeno que ocorre por influência de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que orquestram a arquitetura celular em vários tecidos do corpo no início de sua formação (BOWERS et al., 2006). As de domínio 2 e 4 (BMP2 e 4) são responsáveis por uma cascata de sinalização que quando ativadas modulam a proliferação e o formato (*shape*) das CTMs para células tipo pré-adipócitos, ao passo que inibem sua potencialidade à outras linhagens celulares, como a osteogênica e miogênica (KANG et al., 2007). No entanto, um segundo agente atuando paralelo as BMPs, a via da Wnt, uma proteína que quando ligada ao seu receptor de membrana plasmática (*frizzledreceptors*), ativa um mensageiro secundário, a β -catenina, que transloca-se para o núcleo. Lá sua presença inibe a transcrição de genes que são o gatilho para os processos

seguintes de bem definidos como o “comprometimento” e “diferenciação” (TANG; LANE, 2012). O processo de comprometimento apenas infere que a célula, a partir de então, estará direcionada a determinada linhagem celular. Ela não regressará a CTM, e necessita de outros estímulos locais, originados no próprio tecido para se diferenciar e passar a se comportar como uma célula madura. No entanto, em ensaios *in vitro*, a linhagem CH310T1/2 apesar de apresentar grande plasticidade celular, não é capaz avançar ao próximo estágio de desenvolvimento da célula adiposa. Além da criação dessa linhagem celular, outra foi estabelecida a partir de uma linhagem imortalizada já de pré-adipócitos e então chamadas “3T3-L1” (células oriundas de embriões de camundongos Suíços extraídas prematuramente) (GREEN; KEHINDE, 1974 e 1975), que vem sendo usada até hoje devido a sua confiabilidade em mimetizar adipócitos primários (TANG; LANE, 2012).

4.3.2. Diferenciação

O processo de diferenciação é razoavelmente compreendido *in vitro* a partir de estudos que utilizam pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1, e compreendem estágios precisamente controlados. Para o início do programa de diferenciação (maturação celular) dos pré-adipócitos 3T3-L1, é preciso a administração de indutores químicos presentes em coquetel contendo fator de crescimento semelhante a insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina, soro fetal bovino e agentes secundários (GREEN; KEHINDE, 1974).

Esses indutores estimulam os eventos sequenciais e temporais que dão início ao processo adipogênico. Após a exposição de pré-adipócitos a coquetel contendo os indutores químicos acima descritos ocorrem duas ou três séries de expansão mitótica que são disparados por dois fatores transcricionais, C/EBP β e δ . Estes, por sua vez, iniciam o processo de transcrição de dois outros fatores pró-adipogênicos cruciais para o fenótipo celular do adipócito: PPAR γ e C/EBP α . Quando expressos e, em seu ápice, promovem um rearranjo da matriz extracelular e da arquitetura celular (GUO et al., 2015), estabelecendo uma transição do pré-adipócito com formato tipo fibroblasto (estrelado) para um adipócito maduro, adotando um formato característico esférico. Para que o programa adipogênico ocorra em perfeito estado, ambos C/EBP α e PPAR γ induzem a expressão de outros fatores adipogênicos garantindo a manutenção estrutural celular e a transcrição de outros

fatores relacionados ao fenótipo celular. Tanto C/EBP α quanto PPAR γ quando ectopicamente expressos em células fibroblásticas são capazes de induzir a adipogênese, porém os animais *knockout* das mesmas proteínas desenvolvem resistência adiposo-tecidual à insulina ou morte poucas semanas após o nascimento (FARMER, 2006). Um terceiro fator de transcrição orchestra a expressão de genes relacionados à lipogênese e ao metabolismo lipídico, os SREBPs (proteínas ligantes ao elemento receptor de esteróis). A isoforma SREBP1c é responsável pela expressão de genes relacionados a síntese de ácidos graxos enquanto a SREBP2 estimula a transcrição de genes biosintéticos de colesterol (WHITE; STEPHENS, 2011).

O adipócito maduro já consegue exercer suas funções endócrinas e de estocagem de gotas de gordura. No entanto depende dos reguladores PPAR γ e C/EBP α atuando juntos para manter essas funções metabólicas: Ambos induzem a expressão de genes que estão envolvidos na sensibilidade à insulina, lipogênese e lipólise, transporte de glicose - GLUT4, proteína de ligação de ácidos graxos (FABP4, ou aP2), lipase de lipoproteína, perilipina e hormônios secretados como leptina e adiponectina (LOWE et al., 2011).

Ainda sobre o seu fenótipo, os adipócitos quando imaturos são menores e praticamente com pouco conteúdo de lipídeos em seu interior. Dentro dos adipócitos, a perilipina (PLIN gene), se constitui como uma proteína essencial para a formação da gota de gordura, pois a envolve protegendo-a do meio líquido do citosol. Ao mesmo tempo ela é fundamental no controle da lipólise, pois evita o contato direto de enzimas lipolíticas do meio externo do citosol como a lipase de triacilglicerol de adipócitos (ATGL) (BRASAEMLE, 2007). Além da perilipina, outras proteínas interagem com a gota de gordura durante o processo de lipólise e lipogênese. A proteína de ligação de lipídeos (FABP) em adipócitos (domínio 4) – FABP4 (BAXA et al., 1989), se liga aos ácidos graxos que são expostos após o afastamento das perilipinas (processo no qual elas são fosforiladas e conseqüentemente dispersas para ação da FABP4) provenientes da lipólise, transportando-os pelo meio intra celular do adipócito (FONSECA ALANIZ et al., 2006).

4.4. Exercício e adipogênese

A gênese do tecido adiposo parece sofrer a influência de fatores externos como dieta e atividade física, que modulam os mecanismos de tradução e transcrição de mediadores adipogênicos e que ainda não estão claros nem concisos. O que se tem elucidado é que o exercício físico pode aumentar a taxa de oxidação de ácidos graxos pela ação muscular, equilibrando o balanço energético e sua consequente disfunção tecidual, prevenindo assim algumas doenças como obesidade (associada a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos) e diabetes mellitus tipo 2 (associada a disfunção insulinêmica sobre os adipócitos), entre outras doenças correlatas (STANFORD et al., 2015).

Nos protocolos de treinamento, a periodização dos exercícios (volume e intensidade de cada sessão, além de sua duração), pode interferir no grau de resposta do metabolismo do TAB, como os exercícios aeróbicos sustentados por médios e longos períodos de duração com intensidade moderada em que a taxa de oxidação de ácidos graxos é mais efetiva principalmente porque os níveis de insulina circulantes estão reduzidos, suprimindo a demanda energética limitada de glicogênio para o músculo em atividade (HOROWITZ; KLEIN, 2000). O evento lipolítico em resposta ao exercício pode diminuir o conteúdo interno de triacilglicerol dos adipócitos, ou seja, e o seu volume celular (ASKEW; HECKER, 1976). Esse mecanismo de redução acontece com a hidrólise de triacilglicerol pelas enzimas ATGL e lipase sensível ao hormônio - HSL que agem estimuladas pela redução dos níveis de insulina e ação do PPAR γ 2 (OGASAWARA et al., 2012). Dentre os fatores externos que influenciam tal reação lipolíticas destacam se alguns hormônios como catecolaminas, T3 e T4, GH e insulina (LANGIN, 2006) estimulando ou inibindo mecanismos internos moleculares relacionados ao processo da adipogênico e que participam ativamente a favor da mobilização dessas proteínas. Sakurai et al. (2010) avaliou a expressão de genes adipogênicos da fração vascular do estroma do tecido adiposo epididimal em ratos que realizaram treinamento de corrida em esteira por 9 semanas (treinamento aeróbio). Os animais treinados apresentaram reduções significativas de níveis de expressão de RNAm de PPAR γ e consequente redução de genes transcritos por ele e que são responsáveis por conduzir as características fenotípicas: ácido graxos sintase (FAS), (LPL) e acetil CoA carboxilase (ACC). O trabalho ainda observou que houve aumento da expressão gênica de Pref-1

(preadipocytfactor1), porém diminuição de Wnt10b e β -catenina, responsáveis por manter os adipócitos imaturos. Embora os valores de PPAR γ sejam contraditórios nos dois trabalhos acima os autores afirmam que podem ser atribuídas mais de uma função a esse gene, ele poderia gerenciar tanto fatores responsáveis pelo andamento da adipogênese propriamente dita quanto fatores que caracterizam o fenótipo.

Com relação ao treinamento resistido, não há trabalhos experimentais que investigaram a ação dele sobre a adipogênese no tecido adiposo diretamente. O trabalho de Menukiet al. (2008), observou que o exercício de escalada voluntária pode inibir a expressão de genes adipogênicos como C/EBP β e C/EBP δ além da aP2 em células de medula óssea de camundongos C57BL/6J com apenas 4 dias. Tais alterações, segundo o autor, foram possíveis devido a estímulos mecânicos incididos no tecido ósseo dos animais, e que a característica do exercício utilizado permitiu classifica-lo como resistido devido o próprio peso corporal do animal servia como a carga tracionada durante a subida na escada.

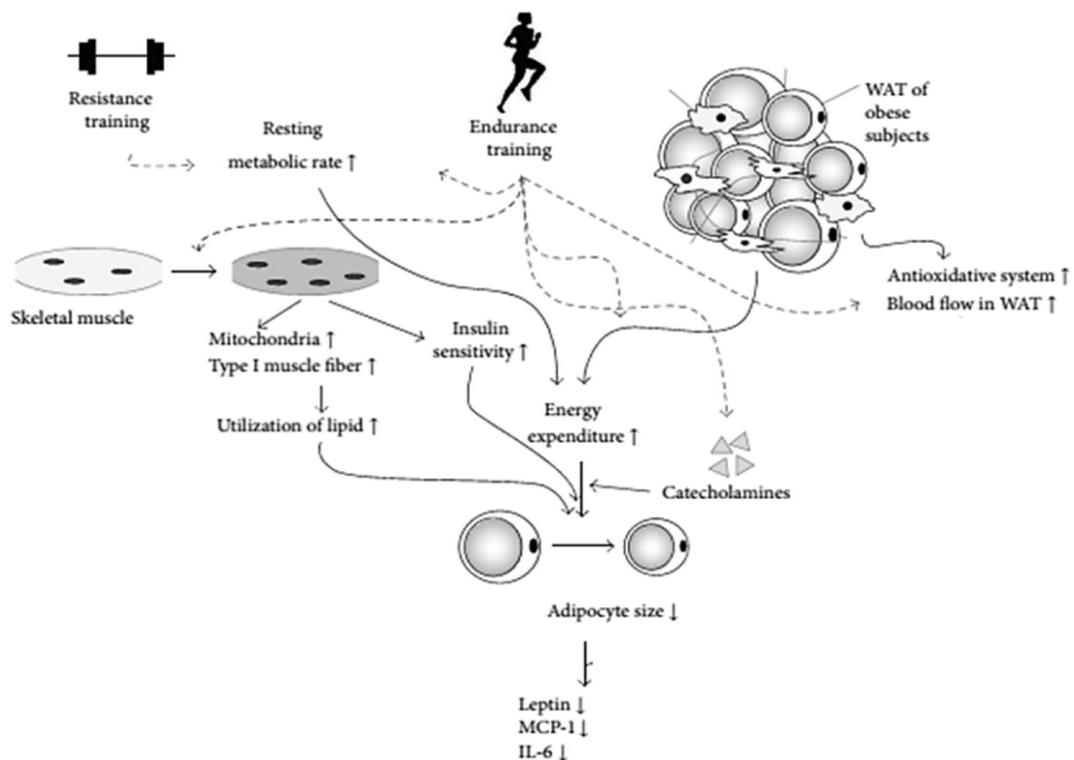


Figura 2. Esquema da diminuição do adipócito e expressão de citocinas pelos tipos de exercício físico: Resistido (com pesos) x Endurance (corrida). WAT – Tecido adiposo branco; MCP-1 – Proteínas quimiotáticas de monócitos 1; IL-6 – interleucina 6 (Adaptado de SAKURAI et al., 2013).

Em outro interessante estudo Case et al. (2012), demonstraram que células mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongos mantidas em placa de cultura e submetidas a estímulos mecânicos em sua base apresentaram reduzida expressão PPAR γ 2, aP2 e adiponectina. A tensão mecânica parece mimetizar o exercício físico resistido sendo que os microimpactos oferecidos na placa estariam ativando a via da β -catenina. No entanto, esse modelo é mais controlado e isolado de diversos outros fatores fisiológicos e o estímulo pouco se equipara ao modelo *in vivo* nem mesmo a uma modalidade de treinamento como a de pesos.

Atualmente, dentre os modelos de treinamento resistido em animais, o aparato de escalada (HORNBERGER; FARRAR, 2004) proporciona um dos melhores mecanismos de treinamento de força para animais por caracterizar um treino com sobrecarga e não utilizar de estímulos elétricos (TAMAKI et al., 1992). Diferente de outros protocolos de alta intensidade realizados em esteira (*sprints*), onde a intensidade é elevada sem uso de sobrepesos (MARCINKO et al., 2015).

Por fim, tanto o treinamento de corrida quanto o de escalada são capazes de modificar o perfil metabólico do tecido adiposo, mas dificilmente os trabalhos atuais conseguem apresentar fortes relações com os modelos de treinamento e os processos de gênese tecidual adiposo. Speretta et. al. (2012) comparou os efeitos de duas modalidades de treinamento: a natação (aeróbico) e a escalada (resistido, com carga atada) para verificar a área dos adipócitos periepididimal e retroperitoneal. O treinamento aeróbico foi eficaz em reduzir os adipócitos dos animais com dieta padrão nos coxins epididimal e retroperitoneal, sendo mais efetivo do que o treinamento resistido inclusive para os adipócitos viscerais em uma comparação entre protocolos de treino.

O exercício físico parece modular de alguma forma a expressão de genes característicos adipogênese por causa e efeito. Afinal, o desenvolvimento dos adipócitos inicia-se com a incorporação de gotas de lipídio em que envolve a ação ao menos de PPAR γ , ATGL e perilipina. No tecido muscular tanto o exercício aeróbico quanto o resistido estimulam vias diferentes de transcrição de proteínas que primam pela adaptação do tecido ao exercício físico (COFFEY; HAWLEY, 2007). Porém há poucos trabalhos observaram características de alguns genes adipogênicos alterados no TAB com intervenções do treinamento aeróbico, sendo

que não há na literatura uma caracterização da expressão desses genes quando usado do treinamento resistido e combinado.

5 METODOLOGIA

5.1. Animais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá para avaliação dos aspectos éticos envolvidos neste trabalho (Protocolo 148/2014, Parecer 009/148) (ANEXO I).

Foram utilizados 80 camundongos da linhagem *Swiss*, machos, com 45 dias de vida, provenientes do Biotério Central e mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (DFS) 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 iniciado às 6 horas), com temperatura controlada de 20 a 24°C, com fornecimento de ração padrão balanceada e água “*ad libitum*”.

5.2. Procedimento experimental

Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos com médias semelhantes de peso, como a seguir: Sedentários – SED (n=20), Treinamento de corrida realizado em esteira (aeróbico) – AER (n=21); Treinamento resistido realizado em escada, (anaeróbico) – RES (n=19); Treinamento combinado (corrida e escalada em dias alternados) – COM (n=20). Todos os grupos de intervenção realizaram os treinamentos às 16 horas, 5x por semana durante 8 semanas, totalizando 40 sessões.

5.3 Protocolo de treinamento Físico

5.3.1. Treinamento Físico Aeróbico

Inicialmente os animais foram submetidos a três dias de adaptação a esteira ergométrica programável (Inbrasport, Porto Alegre, Brasil) (ANEXO 2) adaptada para acomodar 10 camundongos simultaneamente, e ao exercício 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.

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:

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

Essa equação leva em consideração a $V_{completado}$ 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 ($\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$).

5.3.1. Treinamento Físico Resistido

O aparato utilizado para realizar o exercício resistido (força) consistia em uma escada (ANEXO 3) com dimensões de 105 cm de altura por 5 cm de largura (interno), inclinada 80° e com espaçamento de 1 cm entre os degraus. No topo da escada havia uma câmara de 9 x 9 x 9 cm (interno) que servia de abrigo durante o repouso entre as séries de escalada. Para a fixação da sobrecarga foram utilizados alguns itens (duas presilhas, tubo e fita adesiva) além da própria sobrecarga (esferas de chumbo com diferentes pesos 2g, 8g e 12g).

Antes de iniciar o treinamento os animais passaram por adaptação com o aparato que constituída de três tentativas por dia, conduzidos por um período de três dias consecutivos. Antes da primeira tentativa, cada animal ficou dentro da câmara durante 2 minutos (topo da escada) com o intuito de perceber que aquele ambiente

não oferecia perigo. Na primeira tentativa, o animal foi colocado na parte proximal da escada a uma distância de aproximadamente 20 cm da entrada da câmara, sendo esta considerada uma tentativa fácil. Na segunda tentativa, começou na metade da escada (50 cm) considerada uma tentativa de dificuldade média. Na terceira e última tentativa, na parte distal (base) da escada (80 cm), considerado difícil. Quando necessário, estímulos mecânicos manuais eram utilizados na cauda do animal para que ele subisse (estímulos caudais).

Após a familiarização, foi realizado um teste para determinar a carga máxima carregada para cada animal. A primeira escalada era realizada com uma sobrecarga referente a 75% do peso corporal do animal. Em seguida, um incremento de 4g (baseado em 10% do peso corporal) era adicionado, para a execução da segunda série. A cada série vencida era adicionado mais 4g. A falha na execução era determinada quando o animal não conseguisse escalar os degraus mesmo após dado três estímulos caudais sucessivos. A carga máxima (CM) era estabelecida pela maior carga carregada pelo animal por todo o comprimento da escada sem que houvesse falha, ou seja, a última escalada completada com sucesso. Essa carga então era definida como 100% da CM. A quantidade de séries realizadas para atingir a CM poderia variar, sendo nove séries o limite adotado.

Durante todo o período de treinamento os animais eram colocados numa porção da escada em que o possibilitasse de executar de 8 a 12 movimentos (repetições) e a sobrecarga imposta na primeira série, era equivalente a 50% da CM, 75% para a segunda, 90% na terceira e 100% da CM na quarta e última série, com 60 segundos de intervalo entre elas. Os testes subsequentes para reajuste de carga eram realizados no primeiro dia de cada semana, seguindo o mesmo protocolo de treino (4 séries: 50, 75, 90 e 100% da última CM estabelecida) porém era realizado séries adicionais com incremento de 4g a cada série vencida (intervalo de descanso de 120s entre as séries) até que houvesse falha. A nova CM então era estabelecida com a carga em que fora realizado a última escalada com sucesso (sem falhas).

O método de reajuste possibilitou que cada animal se adaptasse ao treino de forma distinta sem que houvesse qualquer outro estresse adicional. O protocolo aplicado foi adaptado de ratos Wistar para camundongos Swiss, seguindo proporções equivalentes de tamanho e peso de acordo com protocolo de (HORNBERGER; FARRAR, 2004). A escolha deste aparato para treinamento

resistido foi devido à rápida adaptação que os animais adquiriam em relação ao aumento de carga e consequente hipertrofia muscular, característica dos treinamentos de força (HORNBERGER; FARRAR, 2004).

5.3.3. Treinamento Físico Combinado

O Treinamento Físico Combinado – COM combinou dos dois treinamentos (corrida – AER e escalada – RES), porém com 20 sessões de cada, no protocolo de 8 semanas. Ambos os treinamentos foram realizados 5 vezes durante 14 dias cada um: sendo 2 sessões de escalada + 3 sessões corrida em uma semana e invertendo as modalidades na outra. Assim o grupo COM realizou 5 sessões de treinos por semana, alternando a cada semana a prevalência de cada modalidade. O teste de carga também foi realizado para as duas modalidades, um em cada semana, sendo que a sessão de teste também foi considerada uma sessão de treino. Ela ocorreu no início da semana, seguindo o seguinte esquema:

Tabela 1 – Esquema das primeiras duas semanas de treinamento do grupo COM.

Semanas	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta
1ª s	ESCALADA*	CORRIDA	ESCALADA	CORRIDA	ESCALADA
2ª s	CORRIDA#	ESCALADA	CORRIDA	ESCALADA	CORRIDA

Esquema de treinamentos de corrida e escalada do grupo combinado por duas semanas seguindo dessa forma até completar 8 semanas. #teste incremental na esteira (aeróbico); *Teste incremental na escada (anaeróbico).

5.4. Coleta dos Tecidos

Ao final do período experimental os animais foram pesados e anestesiados com a mistura de 80 mg de cetamina + 15 mg de xilazina por kilograma de peso corporal, via intraperitoneal. O comprimento naso-anal foi aferido para estipular junto com peso, o Índice Lee ($\text{peso}^{0,333}/\text{CNA}$)(LEE, 1929). Em seguida os animais foram submetidos a uma laparotomia mediana para a coleta de 1mL de sangue por punção cardíaca e remoção dos coxins adiposos inguinal (subcutâneo), mesentérico e retroperitoneal (viscerais) e epididimal.

5.5. Histologia do tecido adiposo branco

Após a coleta dos coxins de gordura (retroperitoneal, mesentérico, periepididimal e inguinal), partes das amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% por 8 horas, lavadas e mantidas em álcool etílico 70%. O protocolo de inclusão em parafina consistiu sequencialmente na: desidratação do material em série de concentrações crescentes de álcool (80%, 92% 95% 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para realização de cortes histológicos semi-seriados (100 µm) de 6 µm de espessura para análise morfométrica. Foram utilizados 5 cortes por lâmina histológica e corados com hematoxilina e eosina (HE), na sequência, 50 imagens foram capturadas em microscópio óptico (*Nikon Eclipse E110, Tokyo, Japan*) com objetiva de 40X; para as análises, 10 imagens foram capturadas e 10 adipócitos cada imagem foram aferidos de cada animal referentes aos diferentes coxins (total de 100 adipócito por coxim) para determinar a média da área em µm² dos adipócitos por meio do programa de análise de imagens - *Image-Pro Plus*[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

5.6. Expressão gênica – RT-PCR

Para a determinação da expressão gênica de PPAR γ , C/EBP α , Pref1 e Perilipina a adotamos a análise por RT-PCR em Tempo Real. O RNA total do tecido adiposo inguinal e retroperitoneal foi isolado utilizando-se o mini kit de purificação de RNA (*PureLink*[®] Life Technologies) seguindo-se o procedimento descrito pelo fabricante. A quantificação do RNA total foi realizada mediante leitura espectrofotométrica da absorbância em 260 nm e as amostras foram armazenadas a -80 °C. A transcrição reversa (RT) para a síntese de cDNA 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) foi congelado em freezer a -20 °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 *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA), em sistema de detecção *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e pares específicos de *primers* (direto e reverso) para os genes alvos. O gene RPL19 foi usado como controle interno (*housekeeping*) para

normalização das amostras. A expressão relativa dos dados foi calculada pelo método delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$ algoritmo)(LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.7. Análise estatística

Foi utilizada a estatística descritiva para análise dos dados. As variáveis foram apresentadas em média \pm erro-padrão da média (EPM). Para verificar a normalidade os dados foram submetidos ao teste *Shapiro-wilk* (quando n acima de 10) ou *Kolmogorov-Smirnov* (quando n abaixo de 10). Para dados normais foi realizado a análise de variância (*ANOVA One-Way*) com *post-hoc* de *Tukey*, e quando não normais o teste de *Kruskal-Wallis* com *post-hoc* de *Dunns*. As análises foram realizadas mediante os programas *Microsoft Office Excel 2010*[®] e *GraphPad Prism*[®] 6.0. O nível de confiança adotado foi de 95%, com erro máximo admitido de 5% para mais ou para menos ($P < 0,05$).

O tamanho de efeito pelo método de “*d* de cohen” foi utilizado para medir o valor dos resultados da área de adipócito e RNAm usando a média do grupo SED comparada isoladamente com a média de cada grupo de intervenção, onde os valores acima de 0,8 foram considerados um tamanho de efeito grande da intervenção pela variável avaliada (COHEN, 1988). O cálculo desconsidera a quantidade da amostra levando-se em consideração o resultado direto do quanto a intervenção pode alterar valores basais quando a análise quantitativa pela estatística convencional não apresenta diferença mesmo havendo alterações relevantes.

6 RESULTADOS

6.1 Teste incremental final

A figura 3. apresenta os resultados dos testes incrementais de V_{pico} para o grupo SED, AER e COM (fig.3A) e Carga atada atingida para o grupo SED, RES e COM (fig.3B) no momento inicial e final do protocolo experimental.

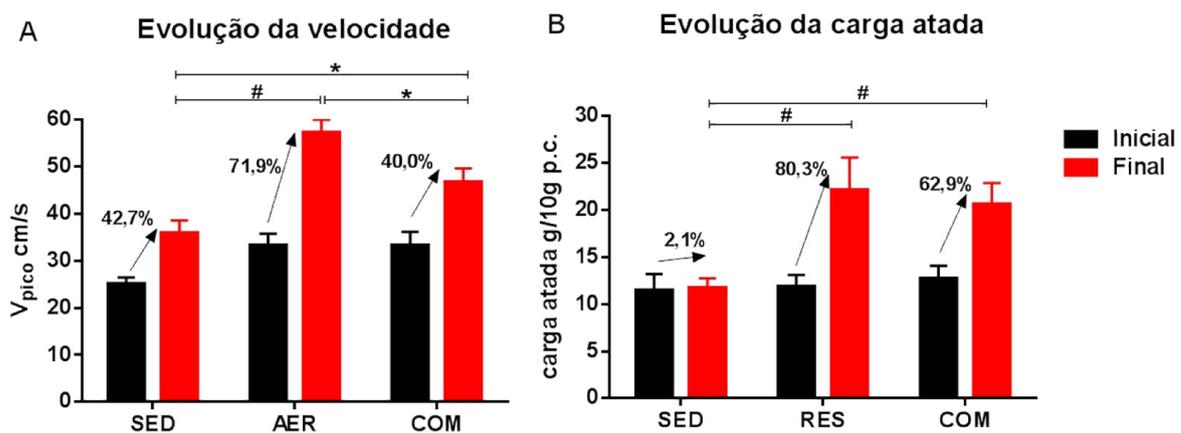


Figura 3. A – Intensidade final atingida em teste dos treinamentos de corrida em esteira para o grupo SED – sedentário (n=10), AER – aeróbico (n=21) e COM – combinado (n=10); B – Teste de força em escada para os grupos sedentário (n=10), RES – resistido (n=19) e combinado (n=20). V_{pico} – velocidade máxima atingida em teste, cm/s – centímetros por segundos, g/10g p.c. – gramas de carga atada por 10 gramas de peso corporal. Valores apresentados em média e erro padrão da média onde * $p < 0,05$ e # $p < 0,0001$ para os momentos finais dos testes entre os grupos, e as \uparrow indicam o aumento percentual do momento Inicial x Final de cada grupo.

A evolução da velocidade em teste incremental na esteira para os grupos SED, AER e COM apresentaram um aumento percentual de 42,7%, 71,9% e 40% respectivamente em 8 semanas do protocolo. Os valores da V_{pico} no momento inicial entre os grupos foram diferentes devido a uma limitação do estudo (discussão). Os valores da V_{pico} no momento final foram diferentes entre todos os grupos sendo o grupo AER aquele que atingiu a maior V_{pico} (SED - $35,9 \pm 2,67$ vs AER - $57,2 \pm 2,76$ vs COM - $46,6 \pm 2,95$ vs SED) (fig.4A).

A evolução da carga atada em teste na escada para os grupos SED, RES e COM apresentaram um aumento percentual 2,1%, 80,3% e 62,9% respectivamente em 8 semanas do protocolo. Os valores da carga atada no momento inicial entre os grupos foram iguais, porém no momento final os grupos treinados foram diferentes do grupo SED (SED - $11,9 \pm 0,33$ vs RES - $22,2 \pm 0,66$ e COM - $21,3 \pm 0,38$) (fig.4B).

6.2 Peso corporal e peso dos coxins viscerais e inguinal.

Os animais foram distribuídos de acordo com o peso para que os grupos iniciassem de forma equivalente no início do protocolo de treino, o peso corporal foi aferido no início e ao final do protocolo experimental.

Tabela 2. Peso corporal do animal (g), delta de peso corporal (g), Índice de Lee (U.A) e peso dos coxins em gramas dividido por 10 gramas de peso corporal.

	Sedentário n=20	Aeróbico n=21	Resistido n=19	Combinado n=20	p
Peso final	43,35 ± 0,75	40,81 ± 0,69	40,53 ± 0,71*	41,08 ± 0,838	0,0377
Δpeso	5,93 ± 0,93	4,17 ± 1,00	3,68 ± 0,83	7,03 ± 0,96	0,0503
Índice de lee	321,10 ± 3,60	316,60 ± 3,34	315,9 ± 3,43	315,8 ± 3,30	0,6590
TAB RET	0,080 ± 0,005	0,047 ± 0,004*	0,038 ± 0,004*	0,039 ± 0,003*	< 0,0001
TAB MES	0,173 ± 0,010	0,130 ± 0,008*	0,122 ± 0,009*	0,124 ± 0,007*	0,0009
TAB EPI	0,246 ± 0,016	0,171 ± 0,011*	0,160 ± 0,010*	0,153 ± 0,009*	< 0,0001
TAB ING	0,096 ± 0,006	0,072 ± 0,022	0,068 ± 0,004*	0,070 ± 0,004*	0,0192
TAB VISC	0,499 ± 0,027	0,348 ± 0,020*	0,320 ± 0,021*	0,317 ± 0,017*	< 0,0001
Σ COXINS	0,595 ± 0,034	0,420 ± 0,024*	0,388 ± 0,024*	0,386 ± 0,020*	< 0,0001

g – gramas, Δpeso – peso final-inicial, TAB – tecido adiposo branco, RET – retroperitoneal, MÊS – mesentérico, EPI – periepididimal, ING – inguinal (subcutânea), VISC – visceral, p.c. – peso corporal. Dados dos diferentes grupos apresentados com média e erro padrão da média. Valores de significância (P), expressos na tabela, todos em relação ao grupo SED.

Ao final de 8 semanas, o grupo RES foi o único que apresentou menor peso corporal do que o grupo SED. Não houve diferença do delta peso nem no índice de Lee (cálculo que mimetiza o índice de massa corporal para o modelo murino) entre os grupos.

Todos os coxins adiposos (retroperitoneal, mesentérico, periepididimal e inguinal) dos grupos RES e COM apresentaram similaridade na diminuição do peso assim como em magnitude de significância quando comparado ao grupo SED. O grupo AER conseguiu apresentar diminuição na adiposidade para todos os coxins viscerais exceto para o coxim inguinal (subcutâneo).

6.3 Área de adipócitos

A figura 4. apresenta a área de adipócitos dos coxins RET, EPI e ING dos diferentes grupos (fig.4.A) e tamanho de efeito da área de adipócitos dos grupos AER, RES e COM relativizados ao grupo SED (linha de base) (fig.4B).

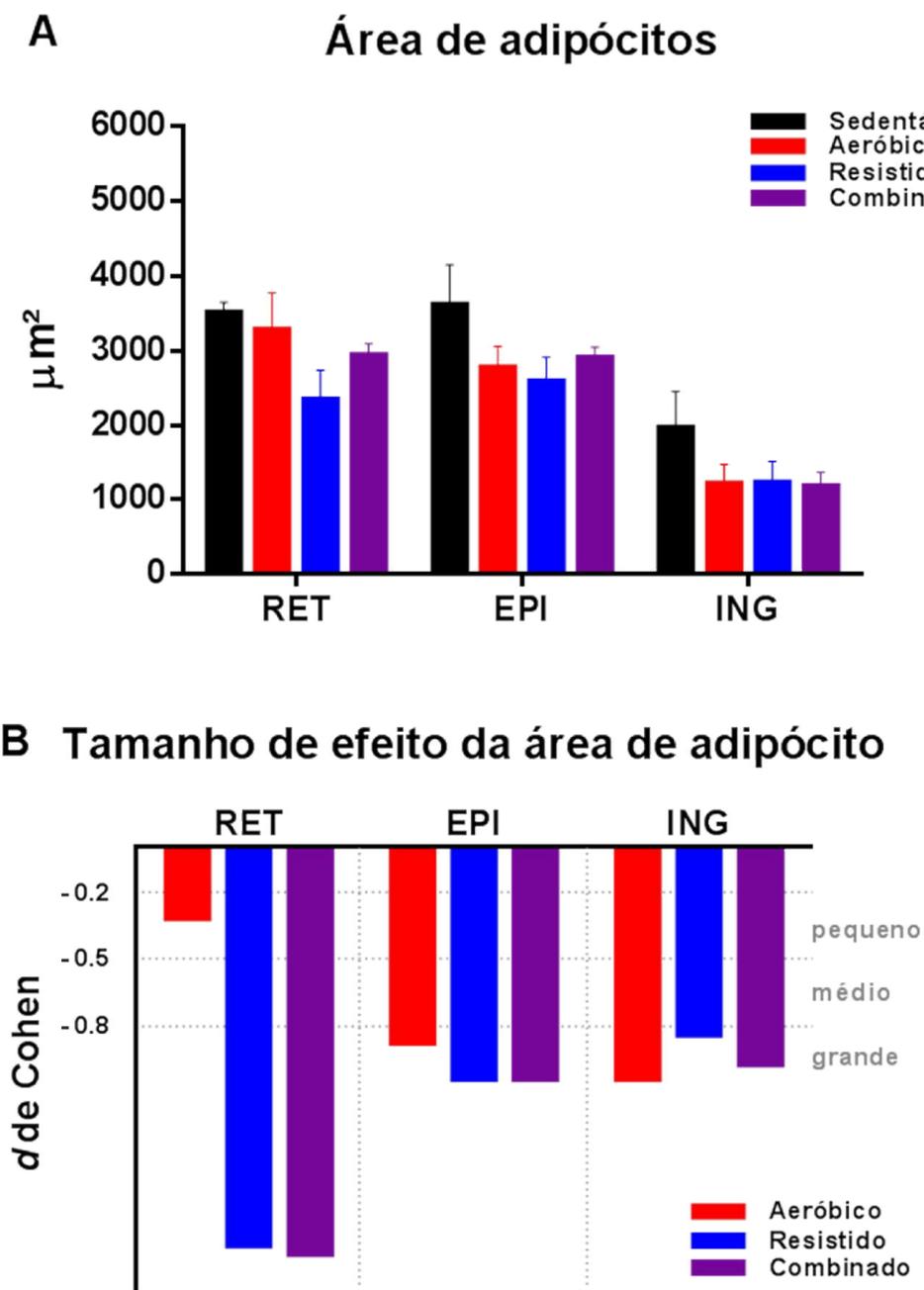


Figura 4. **A** – Área de adipócitos dos grupo: SED – sedentário, AER – aeróbico, RES – resistido e COM – combinado em micrómetros quadrados - μm^2 . (n=4-5). Valores apresentados em média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SED. **B** – Tamanho de efeito do treinamento: RES, AER e COM sobre a área dos adipócitos do tecido adiposo branco RET – retroperitoneal, EPI – periepididimal, ING – inguinal, relativizados ao grupo SED (linha de base). (n=4-5). Valores representados pelo “d de Cohen” onde os valores: 0.2-0.5 – pequeno, 0.5-0.8 – médio e ≥ 0.8 – grande (B).

A análise da área de adipócitos não apresentou qualquer diferença entre os coxins para todos os grupos. No entanto, quando usamos a análise do tamanho de efeito, os grupos AER, RES e COM apresentam um tamanho de efeito grande para menores áreas de adipócitos nos coxins EPI e ING quando comparados ao SED (linha de base). O efeito continua grande para os grupos RES e COM na área de adipócito menores do coxim RET, sendo que o grupo AER apresentou um tamanho efeito pequeno para o mesmo coxim. A fig.5 exemplifica a análise da área de adipócitos pelo cálculo do tamanho de efeito sobre a área de adipócito dos diferentes coxins nos diferentes grupos.

Figura 5. fotomorfometria de cortes histológico do tecido adiposo branco dos diferentes coxins e grupos.

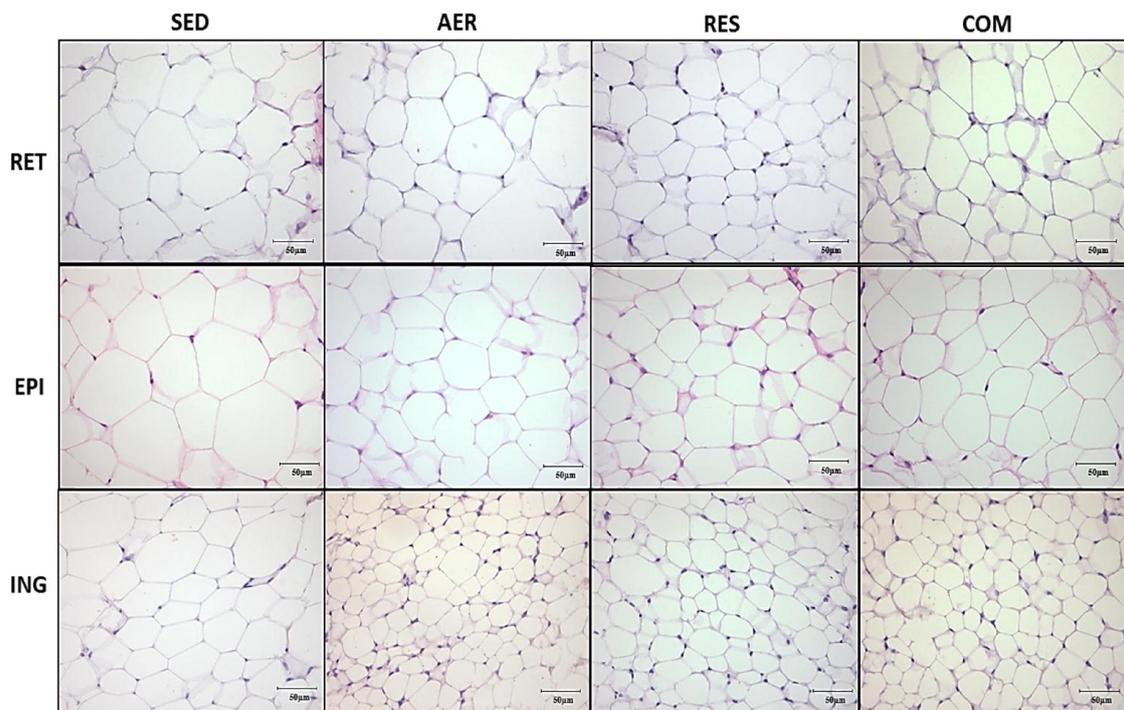


Figura 5. fotomorfometria de cortes histológicos do tecido adiposo branco corados com hematoxilina e eosina dos grupos: SED – sedentário, AER – treinado aeróbico, RES – resistido e COM – combinado para os coxins: RET – retroperitoneal, EPI – periepididimal e ING – inguinal. Escala em 50µm².

6.4 Expressão Gênica

6.4.1. PPAR γ

A figura 6. apresenta a expressão gênica de PPAR γ dos coxins RET e ING dos diferentes grupos (fig.6.A) e tamanho de efeito da expressão gênica de PPAR γ dos grupos AER, RES e COM relativizados ao grupo SED (linha de base) (fig.4B).

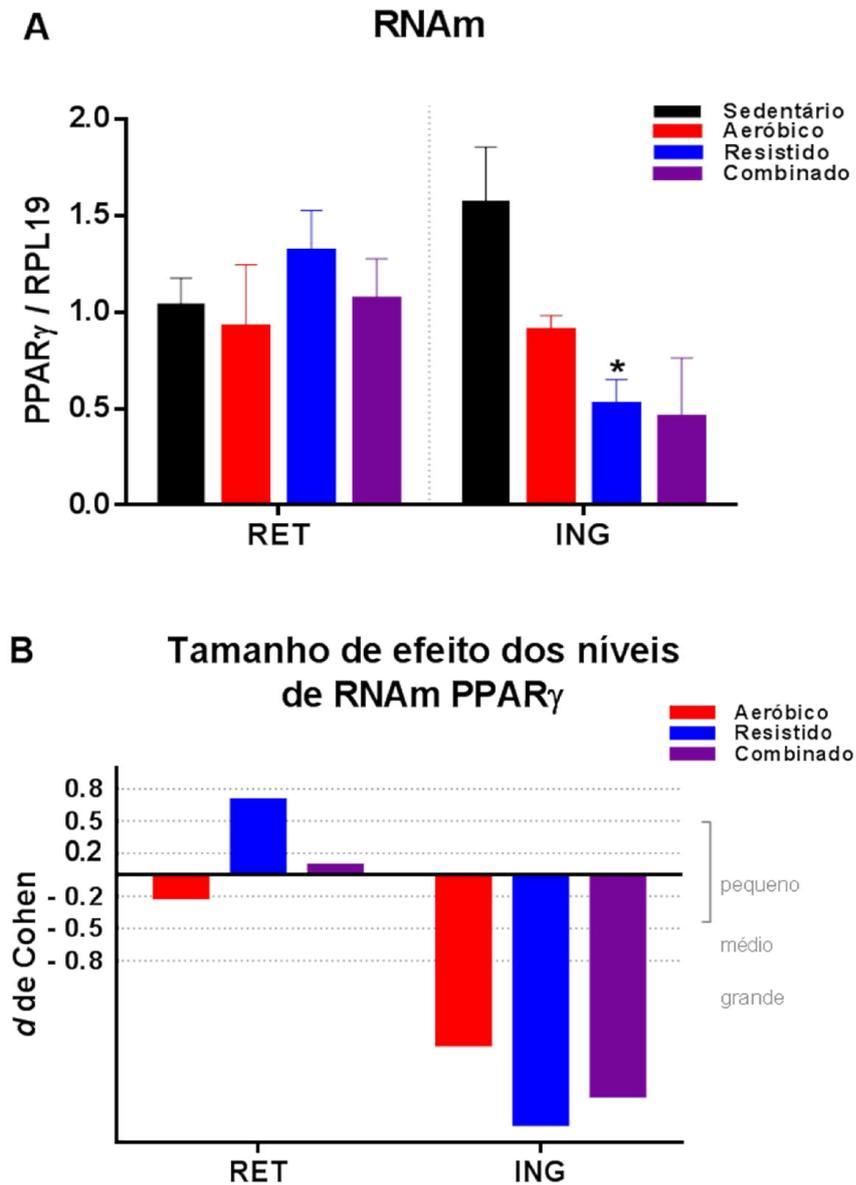


Figura 6. A – Expressão gênica (qPCR) de PPAR γ relativos ao RPL19 – gene controle interno, dos tecidos adiposos RET – retroperitoneal e ING – inguinal dos diferentes grupos SED – sedentário, AER – treinado aeróbico, RES – resistido e COM – combinado (n=4-5). Valores apresentados em média e erro padrão da média. *p<0,05 em relação ao grupo SED. **B** – Tamanho de efeito do grupo AER, RES e COM sobre a expressão de RNAm de PPAR γ dos coxins RET e ING. (n=4-5). Onde valores de “d de Cohen” representam tamanho de efeito: 0.2-0.5 – pequeno, 0.5-0.8 – médio e \geq 0.8 grande, todos em relação a linha de base (valores representativos do grupo SED em comparação direta com cada grupo de intervenção).

6.4.2. C/EBP α

A figura 7. apresenta a expressão gênica de PPAR γ dos coxins RET e ING dos diferentes grupos (fig.7.A) e tamanho de efeito da expressão gênica de PPAR γ dos grupos AER, RES e COM relativizados ao grupo SED (linha de base) (fig.7.B).

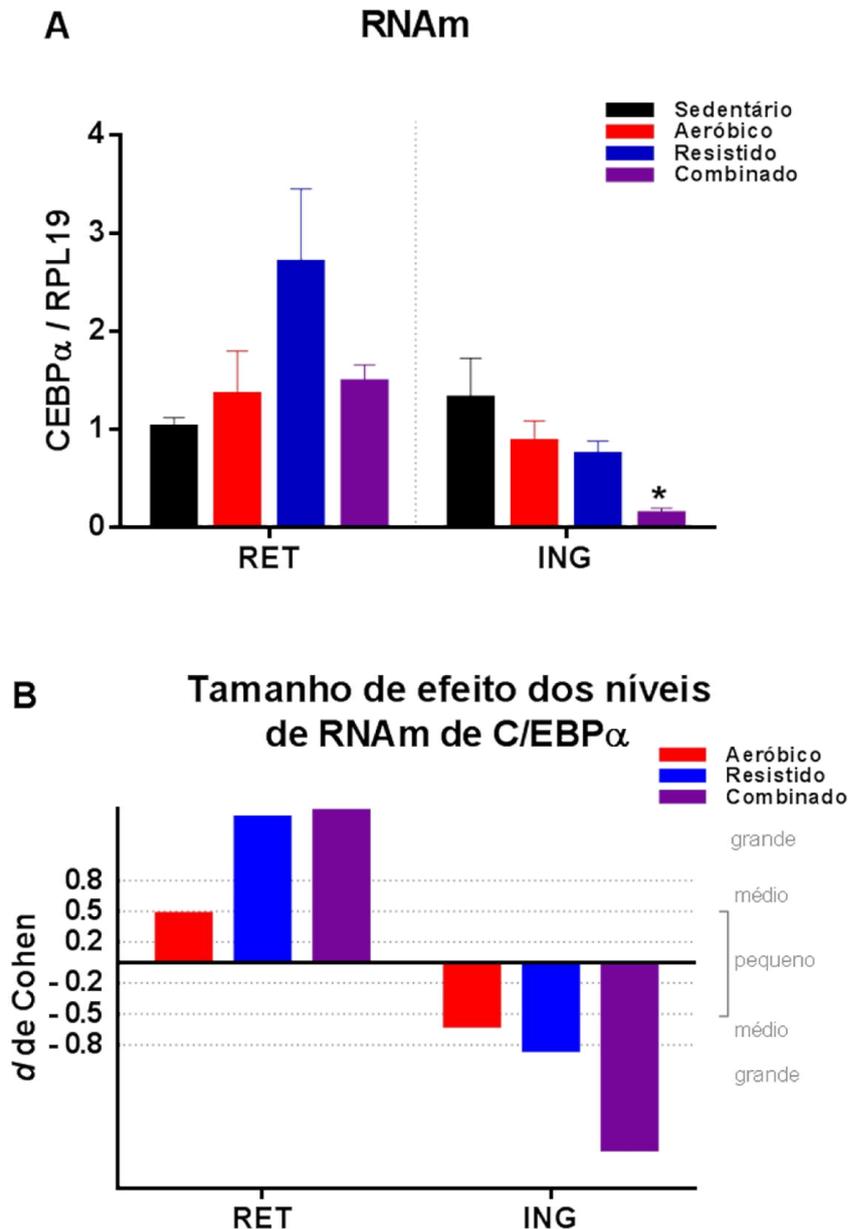


Figura 7. A – Expressão gênica (qPCR) de C/EBP α relativos ao RPL19 – gene controle interno, dos tecidos adiposos RET – retroperitoneal e ING – inguinal dos diferentes grupos SED – sedentário, AER – treinado aeróbico, RES – resistido e COM – combinado (n=4-5). Valores apresentados em média e erro padrão da média. *p<0,05 em relação ao grupo SED. **B** – Tamanho de efeito do grupo AER, RES e COM sobre a expressão de RNAm de C/EBP α dos coxins RET e ING. (n=4-5). Onde valores de “d de Cohen” representam tamanho de efeito: 0.2-0.5 – pequeno, 0.5-0.8 – médio e ≥ 0.8 grande, todos em relação a linha de base (valores representativos do grupo SED em comparação direta com cada grupo de intervenção).

6.4.3. Pref1

A figura 8. apresenta a expressão gênica de PPAR γ dos coxins RET e ING dos diferentes grupos (fig.8.A) e tamanho de efeito da expressão gênica de PPAR γ dos grupos AER, RES e COM relativizados ao grupo SED (linha de base) (fig.8.B).

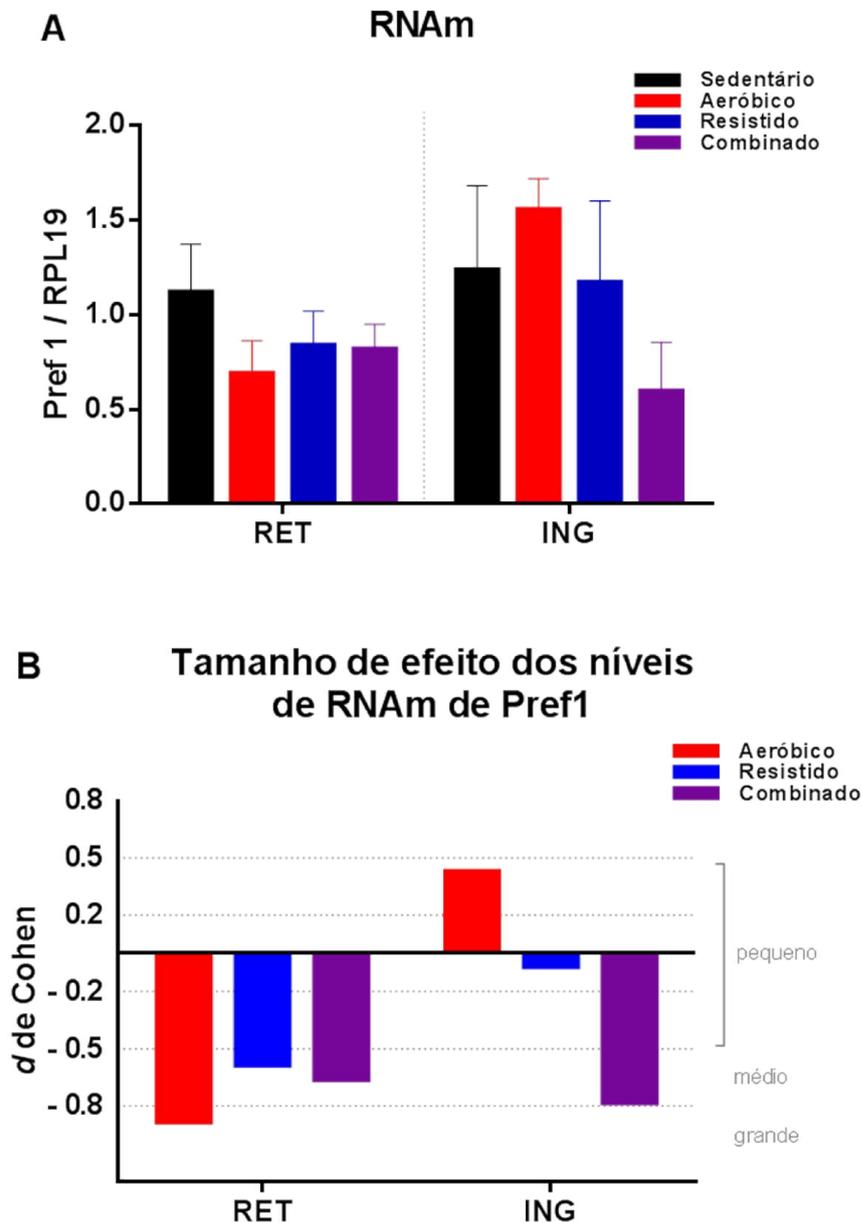


Figura 8. A – Expressão gênica (qPCR) de Pref1 relativos ao RPL19 – gene controle interno, dos tecidos adiposos RET – retroperitoneal e ING – inguinal dos diferentes grupos SED – sedentário, AER – treinado aeróbico, RES – resistido e COM – combinado (n=4-5). Valores apresentados em média e erro padrão da média. *p<0,05 em relação ao grupo SED. **B** – Tamanho de efeito do grupo AER, RES e COM sobre a expressão de RNAm de Pref1 dos coxins RET e ING. (n=4-5). Onde valores de “d de Cohen” representam tamanho de efeito: 0.2-0.5 – pequeno, 0.5-0.8 – médio e ≥ 0.8 grande, todos em relação a linha de base (valores representativos do grupo SED em comparação direta com cada grupo de intervenção).

6.4.4. Perilipina

A figura 9. apresenta a expressão gênica de PPAR γ dos coxins RET e ING dos diferentes grupos (fig.9.A) e tamanho de efeito da expressão gênica de PPAR γ dos grupos AER, RES e COM relativizados ao grupo SED (linha de base) (fig.9.B).

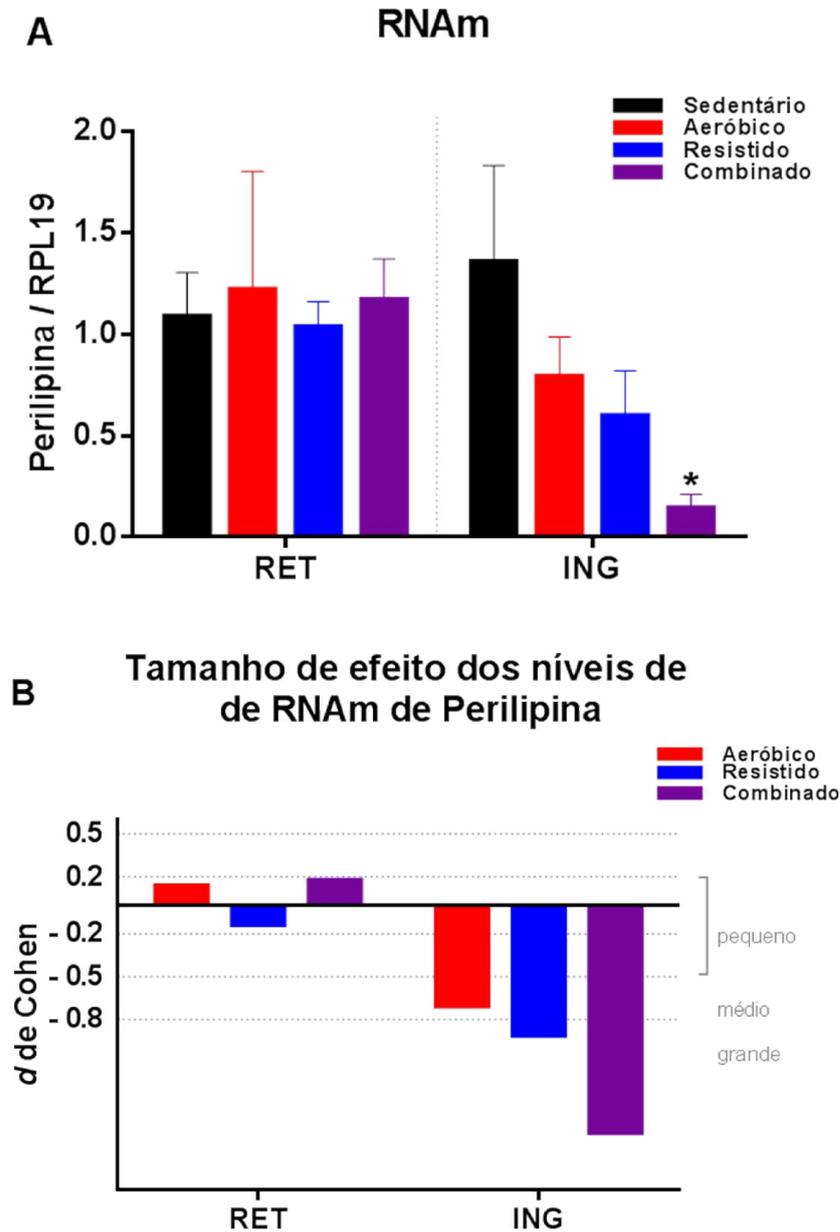


Figura 9. A – Expressão gênica (qPCR) de Perilipina relativos ao RPL19 – gene controle interno, dos tecidos adiposos RET – retroperitoneal e ING – inguinal dos diferentes grupos SED – sedentário, AER – treinado aeróbico, RES – resistido e COM – combinado (n=4-5). Valores apresentados em média e erro padrão da média. *p<0,05 em relação ao grupo SED. **B** – Tamanho de efeito do grupo AER, RES e COM sobre a expressão de RNAm de Perilipina dos coxins RET e ING. (n=4-5). Onde valores de “d de Cohen” representam tamanho de efeito: 0.2-0.5 – pequeno, 0.5-0.8 – médio e ≥ 0.8 grande, todos em relação a linha de base (valores representativos do grupo SED em comparação direta com cada grupo de intervenção).

A análise de RNAm realizada por qPCR, foi utilizada para determinar a expressão dos genes PPAR γ e C/EBP α , dois fatores de transcrição pró-adipogênicos; Pref1, considerado neste estudo como um fator de transcrição anti-adipogênico e perilipina, um marcador característico de adipócitos maduros. Todos eles analisados em dois coxins diferentes nos três grupos de intervenção:

Para o grupo AER, não houve alteração na expressão de qualquer RNAm analisados para os coxins RET e ING. No entanto, o tamanho de efeito foi grande em menor expressão de Pref1 para o coxim RET (fig.8.B) e PPAR γ (fig.6.B) para o coxim ING.

Para o grupo RES, houve diminuição apenas na expressão de PPAR γ unicamente para o coxim ING (fig.6.A). Diferente do tamanho de efeito que foi grande para menor expressão de PPAR γ , C/EBP α e Perilipina apenas para o coxim ING (fig.6.B; 7.B e 9.B respectivamente).

Para o grupo COM, houve diminuição na expressão de C/EBP α (fig.7.A) e Perilipina (fig.9.A) apenas para o coxim ING. Diferente do tamanho de efeito que foi grande para menor expressão de PPAR γ , C/EBP α e Perilipina apenas para o coxim ING (fig.6.B; 7.B e 9.B respectivamente).

DISCUSSÃO

A adipogênese é marcada por vários eventos que vão desde a diferenciação de células primordiais ao amadurecimento dos adipócitos. No controle deste processo diversos estímulos genéticos além dos ambientais como nutrição e gasto energético são decisivos. No presente estudo procurou-se avaliar parâmetros que poderiam ser reflexos ou influenciar de forma direta e indireta a adipogênese frente a diferentes modalidades de treinamento físico como: peso corporal e de diferentes coxins adiposos, área de adipócitos e expressão gênica de PPAR γ , C/EBP α , pref1 e perilipina no tecido adiposo branco.

7.1. Treinamento Físico

As modalidades de treinamento adotadas em nosso estudo diferem entre si devido ao volume e intensidade aplicados serem predominantemente distintos. O treinamento aeróbico aplicado foi de longa duração, 1 hora, com intensidade média de execução correspondente a 70% da V_{pico} com ajuste proposto por Kuipers, utilizado originalmente em protocolos para prescrição de treinamento para humanos (MACHADO et al., 2013; PESERICO et al., 2015) e adaptado neste estudo para o teste em camundongos. Esse parâmetro foi utilizado para a determinação da velocidade de treino para um grande número de animais sem utilização de aparatos que aferem o consumo de oxigênio já que a própria velocidade máxima atingida em teste já poderia corresponder como um melhor preditor de corrida (da SILVA et al. 2014).

O treinamento resistido teve duração curta e intensidade elevada, próxima ao limite do animal para desempenhar o máximo de esforço numa sessão (4-7 min.) e que pudesse estimular efeitos característicos desse tipo de treinamento (HORNBERGER; FARRAR, 2004; DESCHENES; KREAMER, 2012).

Por fim, o treinamento combinado, a intensidade foi equivalente a máxima do animal atingida nos dois testes durante a semana com volume de treino dividido entre as duas modalidades (20 sessões cada) ocasionando desempenho ligeiramente menor que os demais devido o volume e intensidade de treino serem divididos entre as duas modalidades.

Os protocolos adotados mostraram se eficazes inicialmente em um estudo piloto onde os animais apresentaram melhora no desempenho de cada treinamento o que não foi diferente nos protocolos de atual do estudo. Após 8 semanas de intervenção todos os animais treinados apresentaram o desempenho físico melhor que o grupo SED, sendo que o AER apresentou a V_{pico} em teste 59% maior, o RES, em teste apresentou uma carga atada de 86% maior e grupo COM para a V_{pico} e força apresentou 29% e 78% respectivamente maior, todos comparados ao grupo SED.

7.2. Peso Corporal

No início do protocolo experimental os animais apresentavam peso semelhante e foram distribuídos para divisão dos grupos. Ao final do protocolo de treino, o grupo RES foi o único que apresentou menor peso corporal comparado ao sedentário. Há ressalvas relacionadas a esse resultado, já que o estímulo hipertrófico miofibrilar acarretado pelo treinamento resistido poderia aumentar o volume muscular ao passo que diminui o de gordura, muitas vezes mantendo o mesmo peso corporal no estado pré (sujeito obesos (WILLIS et al., 2012)) ao invés de diminuir, como mostrado em nosso estudo. Os nossos resultados diferem do que parece ser mais comum ao estímulo do exercício aeróbico de promover diminuição de peso corporal. Stephenson et al., (2013) realizaram protocolo de treinamento em esteira rolante por 6 semanas (volume total de 10 km) e observaram que até mesmo os animais com capacidade de corrida intrínseca baixa (animais geneticamente modificados devido a sucessivas gerações com baixa resistência física em corrida) tiveram menor peso corporal.

O treinamento combinado poderia ocasionar benefícios mistos dos dois treinamentos para redução de peso corporal, no entanto neste estudo parece que a combinação dos dois estímulos não resultou em alteração do peso corporal, algo que foi verificado também em por WILLIS et al., (2012).

7.3. Adiposidade (peso dos coxins e área de adipócitos).

No presente trabalho todos os grupos de intervenção (AER, RES e COM) apresentaram diminuição do peso de todos os depósitos de gordura (RET, MES, EPI e ING) comparado ao grupo SED, exceto o grupo AER que não apresentou tal alteração para tecido adiposo ING. Este resultado pode indicar que o treinamento

resistido seja, possivelmente, o responsável por tal alteração no coxim ING, pois tanto os grupos RES quanto o COM apresentaram valores semelhantes em peso e magnitude de diferença entre coxins comparado ao SED. Essa diferença ainda aumenta quando observamos os compartimentos adiposos viscerais, isto é, retroperitoneal, mesentérico e periepídidimal (magnitudes de diferença não apresentadas). Poucos trabalhos conseguem apresentar diminuição de peso para todos os coxins aqui aferidos quando administrado o treinamento resistido por 8 semanas. Um resultado semelhante foi observado com 12 semanas de treinamento de força a 3 sessões semanais em um mesmo protocolo de escalada realizado com ratos Wistar de Leite et al. (2013) sendo que os animais que treinaram escalada diminuíram o percentual de gordura (analisado por DEXA - *dual-energy X-ray absorptiometry*).

É possível encontrar tal resultado ainda em humanos, com 12 semanas de treinamento resistido utilizando bandas elásticas, em que cargas correspondentes de 40% a 50% de uma repetição máxima de esforço (1RM) foram suficientes para diminuir a adiposidade subcutânea da região abdominal, mas não a visceral (tomografia computadorizada) em mulheres de meia idade com diabetes do tipo 2 (KWON et al., 2010).

As análises de percentual de gordura corporal apenas por peso não refletem possíveis alterações na área do adipócito nem sobre o estado de maturação destas células. A comparação entre as áreas do adipócito pode nos fornecer informações quanto o estado de desenvolvimento deste sendo que células menores e com pouco conteúdo lipídico em seu interior poderiam indicar um tecido funcional com bom equilíbrio metabólico, enquanto um conjunto de grandes adipócitos normalmente se associam ao aparecimento de alterações metabólicas (ALONSO-VALE et al., 2009).

No atual estudo não houve diferença estatística entre os diferentes grupos para a área dos adipócitos (RET, EPI e ING), embora os tamanhos de efeito dos grupos RES e COM apresentaram relevante redução (<-0.8) quando comparados ao grupo SED isoladamente. Estudos prévios demonstraram que exercício aeróbico (natação) (GUERRA et al., 2007) e treinamento resistido (SPERETTA et al., 2012) (escada ou natação) de 8 semanas foram capazes de ocasionar redução da área de adipócitos (periepídidimal) em ratos Wistar.

A composição corporal nos dá parâmetros importantes para qualificar a saúde dos animais mesmo que ainda de forma indireta. Pontuar essas evidências faz parte de um objetivo maior que foi identificar a expressão de genes relacionados a adipogênese.

7.4. Expressão gênica de marcadores característicos da adipogênese.

Em nosso trabalho o grupo RES foi o único que apresentou menor expressão de RNAm de PPAR γ ($p < 0,05$) em relação ao SED para o coxim inguinal, diferente do tamanho de efeito, que foi grande para os três grupos (AER, RES e COM) indicando redução na expressão desse RNAm em relação a linha de base (SED) para o mesmo coxim. Isso nos mostra que há grandes chances de haver diferenças estatísticas entre os animais que treinaram comparados aos sedentários, sugerindo menor expressão de RNAm de PPAR γ ; o treinamento resistido, isoladamente, parece ser mais efetivo do que os demais grupos para tal. Em nosso estudo não foram analisadas proteínas relacionadas aos eventos lipolíticos, no entanto sabe-se pela literatura que a manutenção desse evento é mantida por proteínas ligadas ao processo adipogênico. Ogasawara et al. (2012), avaliaram a interação entre enzimas lipolíticas (ATGL e HSL) que estavam associadas ao aumento da atividade de PPAR γ 2 (isoforma mais abundante do TAB) no tecido epididimal de ratos Wistar. A expressão elevada desse regulador chave da adipogênese poderiam estar envolvidos na supra atividade da lipase de triacilglicerol no adipócito após protocolo de 8 semanas de treinamento aeróbico. Já em um estudo transversal de Ruschke et al. (2010), que observaram a redução de RNAm de PPAR γ , no tecido adiposo subcutâneo de homens que executaram modalidade aeróbicas combinadas: caminhada, corrida, natação e ciclismo numa mesma sessão de treino, 3 vezes por semana, durante 4 semanas. Os valores reduzidos de PPAR γ ainda foram correlacionados com menores valores de índice de massa corporal, colesterol total e LDL.

Não houve alteração entre os grupos para expressão gênica de PPAR γ no coxim retroperitoneal. Sertie et al. (2013), utilizaram protocolo de treinamento aeróbico semelhante ao nosso estudo e observaram aumento da expressão gênica de PPAR γ e pref1, em células isoladas da fração vascular do estroma do tecido adiposo periepididimal. Conquanto os níveis do RNAm de PPAR γ elevados sozinhos

não são indicativos direto de maior diferenciação de pré-adipócitos, nem de adipogênese.

A expressão de PPAR γ pode estar relacionada com a ativação de vários fatores fenotípicos e pode sofrer a influencia da expressão e outros fatores transcricionais como exemplo do Pref1 que é considerado uma proteína “anti-adipogênica”, que quando ativa em pré-adipócitos aumenta a expressão de Sox9 que, no núcleo, acaba suprimindo a transcrição de fatores pró-adipogênicos como C/EBP β e δ , que temporalmente e sequencialmente antecedem a transcrição dos reguladores chaves da diferenciação, PPAR γ e C/EBP α (WANG et al., 2010). Isso aconteceu em Sakurai et al. (2010) que comparou a expressão de diversos fatores adipogênicos da fração vascular do estroma do coxim periepididimal de ratos Wistar treinados com protocolo de 8 semanas de treinamento aeróbio. Este padrão de expressão sugere que os níveis de PPAR γ foram reduzidos pela ação anti-adipogênica de pref1 e que o exercício de alguma forma contribuiu para essa redução.

Em nosso estudo não houve alteração na expressão do RNAm de pref1, no entanto, apenas o grupo aeróbico apresentou tamanho de efeito grande na redução de Pref1 (abaixo dos níveis do grupo SED), ou seja, o exercício aeróbico poderia ser a última opção como um método de treinamento para elevar a expressão gênica de pref1.

Ainda no contexto da adipogênese, a perilipina desempenha papel fenotípico essencial da célula pois começa ser transcrita quando se inicia a diferenciação do adipócito e sua expressão se torna proporcional ao passo que aumenta o tamanho da gota de gordura, demonstrando assim ser um ótimo marcador de adipócitos maduros (LYU et al., 2015). Em nosso trabalho, o grupo COM foi o único que apresentou menor expressão do RNAm da perilipina no coxim inguinal, algo constatado tanto pela análise estatística quanto pelo tamanho de efeito. Além do grupo COM, o RES também apresentou tamanho de efeito grande na redução de RNAm de perilipina, no entanto não houve diferença entre o grupos para o coxim retroperitoneal. A expressão reduzida de perilipina pode indicar menor diferenciação dos adipócitos, ou seja, maior número de pré-adipócitos nos grupos RES e COM do que adipócitos maduros comparados ao grupo SED. Dentro do programa adipogênico, *in vitro*, em condições favoráveis, entendemos que falta ou a diminuta

expressão dessa proteína caracterizaria a diminuição do processo de amadurecimento de adipócitos, porém não impossibilitaria a gênese de pré-adipócitos, já que dois reguladores-chaves desse programa PPAR γ e a C/EBP α cooperam entre si regulando a manutenção estrutural e funcional do evento adipogênico (PROENÇA et al., 2014).

Sabendo que a presença reduzida de adipócitos maduros diminuiria a capacidade geral do tecido de exercer sua função lipogênica já faz do exercício combinado uma ferramenta importante para conter a adiposidade, o que o torna uma boa escolha para o tratamento de doenças como a obesidade. Interessantemente, no estudo de Covington et al. (2015), os autores encontraram níveis elevados de perilipina 1, 3 e 5 em mulheres com síndrome do ovário policístico que, após 16 semanas de treinamento aeróbio, apresentaram manutenção apenas da expressão da perilipina 3. Os autores sugerem que essa isoforma está diretamente associada a proteínas lipolíticas como a ATGL e CGI-58 (*Comparative gene identification 58* – proteína associada a gota de gordura que participa da hidrólise de triacilglicerol mediada por ATGL). Essa associação foi confirmada recentemente em ratos sprague dawley submetidos a 8 semanas de treinamento aeróbico em esteira (RAMOS et al., 2016).

A literatura aqui referenciada apresenta alguns estudos com exercício e a expressão de genes adipogênicos, no entanto nenhum destes estudos tiveram como objetivo central a diferença de três modalidades do exercício nesse evento, assim como tivemos. Vale a ressalva de que todos os trabalhos encontrados que avaliaram os níveis de PPAR γ , C/EBP α , pref1 e/ou perilipina tendo o exercício como intervenção, utilizaram o coxim periepídimal para tal avaliação, diferente do que decidimos utilizar (retroperitoneal e inguinal). A escolha do coxim retroperitoneal como sendo um depósito de gordura visceral e o inguinal como sendo um depósito subcutâneo. No entanto este é o primeiro estudo que avaliou a expressão dos principais marcadores adipogênicos de dois compartimentos de gorduras que sofrem influência metabólicas distintas de animais que passaram por três programas de treinamentos mais praticados entre humanos.

As maiores alterações aqui observadas foram no coxim inguinal. Este parece responder melhor aos treinamentos resistido e combinado, diminuindo o peso de todos os coxins adiposos e a expressão dos genes PPAR γ para o grupo RES e,

C/EBP α e perilipina para o grupo COM. Podemos desde já supor que o treinamento resistido utilizando aparato de escalada em camundongos *Swiss* tanto para o grupo RES quanto para o grupo COM contribuiu de forma mais eficaz para a diminuição do evento adipogênico.

De acordo com o tamanho de efeito (*d* de cohen) os grupos RES e COM apresentam também grandes chances de minimizar o processo adipogênico no tecido adiposo subcutâneo, principalmente pelos fatores adipogênicos chaves PPAR γ , C/EBP α e perilipina estarem expressos bem abaixo da linha de base (SED) o que caracterizaria de fato menor processo adipogênico. No entanto, em nenhum momento tal evento pareceu ser freado por qualquer treinamento no tecido adiposo retroperitoneal. Compreender essa complexa rede molecular que controla o processo adipogênico torna se importante para delinear estratégias de tratamento de doenças que alteram a estrutura e função do tecido adiposo como a obesidade e lipodistrofia. A partir deste trabalho, o treinamento resistido e o combinado parece ser uma boa ferramenta de acompanhamento contínuo.

Tabela 3. Apresenta o resumo dos resultados obtidos comparados ao grupo SED.

	AERÓBICO	RESISTIDO	COMBINADO
Peso Final	↔	↓	↔
Δ peso	↔	↔	↔
Índice De Lee	↔	↔	↔
Peso coxim RET	↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓
Peso coxim MÊS	↓	↓↓↓	↓↓↓
Peso coxim EPI	↓↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓
Σ Peso Visceral	↓↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓
Peso coxim ING	↔	↓	↓
Σ Peso total	↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓
Área adipócito RET	↔	↔	↔
Área adipócito ING	↔	↔	↔
RNA_m			
PPAR_γ	↔	↓	↔
Coxim			
C/EBP_α	↔	↔	↓
RET			
Pref1	↔	↔	↔
Perilipina	↔	↔	↓
RNA_m			
PPAR_γ	↔	↔	↔
Coxim			
C/EBP_α	↔	↔	↔
ING			
Pref1	↔	↔	↔
Perilipina	↔	↔	↔

↔ - não houve diferença estatística; ↓ - redução com diferença estatística onde o $p < 0,05$; ↓↓ - redução com diferença estatística onde $p < 0,01$; ↓↓↓ - redução com diferença estatística onde $p < 0,001$; ↓↓↓↓ - redução com diferença estatística onde $p < 0,0001$.

Tabela 4. apresenta o resumo do Tamanho de Efeito dos resultados obtidos comparados ao grupo SED.

		AERÓBICO	RESISTIDO	COMBINADO
Área adipócito	RET	↓	↓↓↓	↓↓↓
Área adipócito	ING	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
RNAm	PPARγ	↓	↑↑	↔
RNAm	PPARγ	↑	↑↑↑	↑↑↑
Coxim	C/EBPα	↓↓↓	↓↓	↓↓
RET	Pref1	↔	↔	↔
	Perilipina	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
RNAm	PPARγ	↓↓	↓↓↓	↓↓↓
Coxim	C/EBPα	↑↑	↔	↓↓
ING	Pref1	↓↓	↓↓↓	↓↓↓
	Perilipina	↓↓	↓↓↓	↓↓↓

↔ - Não houve tamanho de grande relevante; Tamanhos de efeitos acima da linha de base: ↑ >0.2, ↑↑ >0.5 e ↑↑↑ >0.8. Tamanhos de efeitos abaixo da linha de base: ↓ >-0.2, ↓↓ >-0.5, ↓↓↓ >-0.8.

8 CONCLUSÃO

Em nosso estudo o exercício combinado induziu menor expressão gênica de C/EBP α e Perilipina, enquanto o grupo RES apresentou menor expressão de gênica de PPAR γ , alterações correspondente ao coxim inguinal. O exercício aeróbico isoladamente não apresentou qualquer alteração na expressão gênica. Nenhuma alteração foi averiguada no coxim retroperitoneal.

O grupo RES e COM apresentaram menor peso de todos os coxins viscerais e inguinal. O grupo AER diminuiu o peso apenas dos coxins viscerais

Não foi encontrada diferença estatística na análise de área dos adipócitos, embora haja tamanho de efeito grande e negativo para os grupos AER, para os coxins EPI e ING e os grupos RES e COM para os coxins RET, EPI e ING.

Desta forma, podemos concluir que o tipo de exercício bem como o coxim parecem influenciar nos padrões de adaptações analisados. De qualquer forma, o treinamento físico é um estímulo eficiente na modulação da adipogênese *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ACHTEN, J.; JEUKENDRUP, A. E. Optimizing fat oxidation through exercise and diet. **Nutrition**, v. 20, n. 7-8, p. 716–727, 2004.

ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F. B. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 582–594, 2009.

ASKEW, E. W.; HECKER, A. L. Adipose tissue cell size and lipolysis in the rat: response to exercise intensity and food restriction. **The Journal of nutrition**, v. 106, n. 9, p. 1351–1360, 1976.

ASHWELL, M.; CHINN, S.; STALLEY, S.; GARROW, J. S. Female fat distribution—a photographic and cellularity study. **International journal of obesity**, v. 2, n. 3, p. 289–302, 1978.

BAKKER, A. H. F.; DIELEN, F. M. H. VAN; GREVE, J. W. M.; ADAM, J. A.; BUURMAN, W. A. Preadipocyte number in omental and subcutaneous adipose tissue of obese individuals. **Obesity research**, v. 12, n. 3, p. 488–98, 2004.

BAXA, C. A.; SHA, R. S.; BUELT, M. K.; SMITH, A. J.; MATARESE, V.; CHINANDER, L. L.; BOUNDY, K. L.; BERNLOHR, D. A. Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. **Biochemistry**, v. 28, n. 22, p. 8683–8690, 1989.

BALDUCCI, S.; ZANUSO, S.; NICOLUCCI, A.; FERNANDO, F.; CAVALLO, S.; CARDELLI, P.; FALLUCCA, S.; ALESSI, E.; LETIZIA, C.; JIMENEZ, A.; FALLUCCA, F.; PUGLIESE G. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 8, p. 608–617, 2010.

BATISTA, M. L.; HENRIQUES, F. S.; NEVES, R. X.; OLIVAN, M. R.; MATOS-NETO, E. M.; ALCÂNTARA, P. S. M.; MAXIMIANO, L. F.; OTOCH, J. P.; ALVES, M. J.; MARÍLIA SEELAENDER. Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 7, n. 1, p. 37–47, 2016.

BEHRENS, G. M. N.; GRINSPOON, S.; CARR, A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p. 1721–1722, 2005.

BOWERS, R. R.; KIM, J. W.; OTTO, T. C.; LANE, M. D. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 103, n. 35, p. 13022–13027, 2006.

BRASAEMLE, D. L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 12, p. 2547–2559, 2007.

BRONDANI, L. D. A.; ASSMANN, T. S.; DUARTE, G. C. K.; et al. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 4, p. 215–225, 2012.

CHUDECKA, M.; LUBKOWSKA, A.; KEMPIŃSKA-PODHORODECKA, A. Body surface temperature distribution in relation to body composition in obese women. **Journal of thermal biology**, v. 43, p. 1–6, 2014.

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

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. 2nd ed. Hillsdale, New Jersey: L. 1988.

COVINGTON, J. D.; BAJPEYI, S.; MORO, C.; TCHOUKALOVA, Y. D.; EBENEZER, P. J.; BURK, D. H.; RAVUSSIN, E.; L. M. REDMAN. Potential effects of aerobic exercise on the expression of perilipin 3 in the adipose tissue of women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. **European journal of endocrinology**, v. 172, n. 1, p. 47–58, 2015.

Da SILVA, D. F.; SIMÕES, H. G.; MACHADO, F. A. vVO_{2max} versus V peak, what is the best predictor of running performances in middle-aged recreationally-trained runners? **Science & Sports**, v. 30, n. 4, p. e85-e92, 2015.

DESCHENES, M. R.; KRAEMER, W.J. Performance and physiologic adaptations to resistance training. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 81, n. 11, p. S3-S16, 2002.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162-184, 2013.

FARMER, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell metabolism**, v. 4, n. 4, p. 263-273, 2006.

FONSECA ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216–229, 2006.

GALLAGHER, D.; HEYMSFIELD, S. B.; HEO, M.; JEBB, S. A.; MURGATROYD, P. R.; SAKAMOTO, Y. Healthy percentage body fat ranges: An approach for developing guidelines based on body mass index. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 694–701, 2000.

GIORDANO, A.; SMORLESI, A.; FRONTINI, A.; BARBATELLI, G.; CINT, S. White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. **European Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 5, 2014.

GONZÁLEZ-GROSS, M.; MELÉNDEZ, A. Sedentarism, active lifestyle and sport: Impact on health and obesity prevention. **Nutrición hospitalaria**, v. 28, p. 89–98, 2013.

GREEN, H.; KEHINDE, O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. **Cell**, v. 1, n. 3, p. 113–116, 1974.

GUERRA, R. L. F.; PRADO, W. L.; CHEIK, N. C.; et al. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. **Lipids in health and disease**, v. 6, p. 16, 2007.

GUO, L.; LI, X.; TANG, Q-Q. Transcriptional Regulation of Adipocyte Differentiation: A Central Role for CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 2, p. 755–761, 2015.

GUSTAFSON, B.; HEDJAZIFAR, S.; GOGG, S.; HAMMARSTEDT, A.; SMITH, U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 4, p. 193–200, 2015.

HAJER, G. R.; HAEFTEN, T. W. VAN; VISSEREN, F. L. J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **European Heart Journal**, v. 29, n. 24, p. 2959–2971, 2008.

VAN HALL, G. The Physiological Regulation of Skeletal Muscle Fatty Acid Supply and Oxidation During Moderate-Intensity Exercise. **Sports Medicine**, v. 45, n. 1, p. 23–32, 2015.

HORNBERGER, T. A. J.; 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.

HOROWITZ, J. F.; KLEIN, S. Lipid metabolism during endurance exercise. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2, p. 558S–63S, 2000.

KANG, S.; BENNETT, C. N.; GERIN, I.; et al. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein α and peroxisome proliferator-activated receptor γ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 19, p. 14515–14524, 2007.

KERSTEN, S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1841, n. 7, p. 919–33, 2014.

KWON, H. R.; HAN, K. A.; KU, Y. H.; Ahn, H. J.; KOO, B-K.; KIM, H. C.; MIN K. W. The effects of resistance training on muscle and body fat mass and muscle strength in type 2 diabetic women. **Korean diabetes journal**, v. 34, n. 2, p. 101–10, 2010.

- LANGIN, D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v. 53, n. 6, p. 482-491, 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.
- LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. **American Journal of Physiology**, v. 89, n.1, p. 24-33, 1929.
- LEITE, R. D.; DURIGAN, R. D. C. M.; LINO, A. D. de S.; CAMPOS, M. V. DE S.; SOUZA, M. DAS G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BOUSKELAB, E.; KRAEMER-AGUIAR, L. G. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 62, n. 10, p. 1477–1484, 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** (San Diego, Calif.), v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LOWE, C. E.; O'RAHILLY, S.; ROCHFORD, J. J. Adipogenesis at a glance. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 16, p. 2681–2686, 2011.
- LYU, Y.; SU, X.; DENG, J.; ET AL. LIU, S.; ZOU, L.; ZHAO, X.; WEI, S.; GENG, B.; XU G. Defective differentiation of adipose precursor cells from lipodystrophic mice lacking perilipin 1. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2015.
- MACHADO, F. A.; KRAVCHYCHYN, A. C. P.; PESERICO, C. S., DA SILVA D. F.; MEZZARROBA, P. V. Incremental test design, peak 'aerobic' running speed and endurance performance in runners. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 16, n. 6, p. 577-582, 2013.
- MANTEIGA, S.; CHOI, K.; JAYARAMAN, A.; LEE, K. Systems biology of adipose tissue metabolism: regulation of growth, signaling and inflammation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 5, n. 4, p. 425–447, 2013.
- MARCINKO, K.; SIKKEMA, S. R.; SAMAN, M. C.; KEMP, B. E.; FULLERTON, M. D.; STEINBERG G. R. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 12, p. 903–915, 2015.
- MENUKI, K.; MORI, T.; SAKAI, A.; SAKUMA, M.; OKIMOTO, N.; SHIMIZU, Y.; KUNUGITA, N.; NAKAMURA T. Climbing exercise enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation with high expression of PTH/PTHrP receptor in bone marrow cells. **Bone**, v. 43, n. 3, p. 613-620, 2008.

MONTEIRO, P. A.; CHEN, K. Y.; LIRA, F. S.; SARAIVA, B. T. C.; ANTUNES, B. M. M.; CAMPOS, E. Z.; FREITASjr I. F. Concurrent and aerobic exercise training promote similar benefits in body composition and metabolic profiles in obese adolescents. **Lipids in health and disease**, v. 14, p. 153, 2015.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19· 2 million participants. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377-1396, 2016.

OGASAWARA, J.; SAKURAI, T.; KIZAKI, T.; ISHIBASHI, Y.; IZAWA, T.; SUMITANI, Y.; ISHIDA, H.; RADAK, Z.; HAGA, S.; OHNO H. Higher levels of ATGL are associated with exercise-induced enhancement of lipolysis in rat epididymal adipocytes. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e40876, 2012.

ORMSBEE, M. J.; THYFAULT, J. P.; JOHNSON, E. A.; KRAUS, R. M.; CHOI, M. D.; HICKNER, R. C. Fat metabolism and acute resistance exercise in trained men. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 5, p. 1767-1772, 2007.

PESERICO, C. S.; ZAGATTO, A. M.; MACHADO, F. A. Evaluation of the Best-designed Graded Exercise Test to Assess Peak Treadmill Speed. **International Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 9, p. 729–734, 2015.

PETRUZZELLI, M.; SCHWEIGER, M.; SCHREIBER, R.; CAMPOS-OLIVAS R.; TSOLI, M.; ALLEN, J.; SWARBRICK, M.; ROSE-JOHN, S.; RINCON, M.; ROBERTSON, G.; ZECHNER, R.; WAGNER E. F. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 433–447, 2014.

PROENÇA, A. R. G.; SERTIÉ, R. A L.; OLIVEIRA, A. C.; CAMPAÑA, A. B.; CAMINHOTTO, R. O.; CHIMIN, P.; LIMA, F. B. New concepts in white adipose tissue physiology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, p. 192–205, 2014.

RAMOS, S. V.; TURNBULL, P. C.; MACPHERSON, R. E. K. Adipose tissue depot specific differences of PLIN protein content in endurance trained rats. **Adipocyte**, v. 3945, n. March, p. 1–12, 2016.

REZNIKOFF, C. A.; BRANKOW, D. W.; HEIDELBERGER, C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. **Cancer research**, v. 33, p. 3231–3238, 1973.

RUSCHKE, K.; FISHBEIN, L.; DIETRICH, A.; KLÖTING, N.; TÖNJES, A.; OBERBACH, A.; FASSHAUER, M.; JENKNER, J.; SCHÖN, M. R.; BLÜHER, M.; MANTZOROS, C. S. Gene expression of PPAR γ and PGC-1 α in human omental and subcutaneous adipose tissues is related to insulin resistance markers and mediates beneficial effects of physical training. **European Journal of Endocrinology**, v. 162, n. 3, p. 515-523, 2010.

SAKURAI, T.; ENDO, S.; HATANO, D.; OGASAWARA, J.; KIZAKI, T.; OH-ISHI, S.; IZAWA, T.; ISHIDA H.; OHNO, H. Effects of exercise training on adipogenesis of stromal-vascular fraction cells in rat epididymal white adipose tissue. **Acta physiologica**, v. 200, n. 4, p. 325-338, 2010.

SAKURAI, T.; OGASAWARA, J.; KIZAKI, T.; SATO, S.; ISHIBASHI, Y.; TAKAHASHI, M.; KOBAYASHI, O.; OH-ISHI, S.; NAGASAWA, J.; TAKAHASHI, K.; ISHIDA, H.; IZAWA, T.; OHNO, H. The effects of exercise training on obesity-induced dysregulated expression of adipokines in white adipose tissue. **International journal of endocrinology**, v. 2013, p. 801743, 2013.

SEN, B.; XIE, Z.; CASE, N.; MA, M. RUBIN, C.; RUBIN, J. Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable β -catenin signal. **Endocrinology**, v. 149, n. 12, p. 6065-6075, 2008.

SERTIE, R. A. L.; ANDREOTTI, S.; PROENÇA, A. R. G.; CAMPANA, A. B.; LIMA-SALGADO, T. M. BATISTA, M. L.; SEELAENDER, M. C. L.; CURI, R.; OLIVEIRA, A. C.; LIMA, F. B. Cessation of physical exercise changes metabolism and modifies the adipocyte cellularity of the periepididymal white adipose tissue in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 3, p. 394-402, 2013.

SMITH, S. R.; LOVEJOY, J. C.; GREENWAY, F.; RYAN, D.; DE LA BRETONNE, J.; VOLAFOVA, J.; BRAY, G. A. Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 50, n. 4, p. 425–35, 2001.

SPERETTA, G. F. F.; ROSANTE, M. C.; DUARTE, F. O.; LEITE, R. D.; LINO, A. D. DE S.; ANDRE, R. A.; SILVESTRE, J. G. DE O.; DE ARAUJO, H. S. S.; DUARTE, A. C. G. DE O. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 67, n. 12, p. 1469–77, 2012.

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

STEPHENSON, E. J.; LESSARD, S. J.; RIVAS, D. A.; WATT, M. J.; YASPELKIS, B. B.; KOCH, L. G. BRITTON, S. L.; HAWLEY, J. A. Exercise training enhances white adipose tissue metabolism in rats selectively bred for low-or high-endurance running capacity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 3, p. E429-E438, 2013.

STRASSER, B.; SIEBERT, U.; SCHOBERSBERGER, W. Resistance training in the treatment of the metabolic syndrome. **Sports medicine**, v. 40, n. 5, p. 397-415, 2010.

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

SWINBURN, B. A; SACKS, G.; HALL, K. D.; MCPHERSON, K.; FINEGOOD, D. T.; MOODIE, M. L.; GORTMAKER, S. L. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **Lancet**, v. 378, n. 9793, p. 804–14, 2011.

TAMAKI, T.; UCHIYAMA, S.; NAKANO, S. A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 24, n. 8, p. 881-886, 1992.

TANG, Q. Q.; LANE, M. D. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 715–736, 2012.

VISSERS, D.; HENS, W.; TAEYMANS, J.; BAEYENS, J-P.; POORTMANS, J.; GAAL, L. VAN. The effect of exercise on visceral adipose tissue in overweight adults: a systematic review and meta-analysis. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. e56415, 2013.

WALDEN, T. B.; HANSEN, I. R.; TIMMONS, J. A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 1, p. E19–E31, 2012.

WALKER, G. E.; MARZULLO, P.; RICOTTI, R.; BONA, G.; PRODAM, F. The pathophysiology of abdominal adipose tissue depots in health and disease. **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v. 19, n. 1, p. 57–74, 2014.

WANG, Y.; HUDAK, C.; SUL, H. S. Role of preadipocyte factor 1 in adipocyte differentiation. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 5, n. 1, p. 109–115, 2010.

WELLS, J. C. K. Sexual dimorphism of body composition. Best practice & research. **Journal of Clinical endocrinology & metabolism**, v. 21, n. 3, p. 415–430, 2007.

WHITE, U. A; STEPHENS, J. M. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 318, n. 1-2, p. 10–14, 2011.

WILLIS, L. H.; SLENTZ, C. A; BATEMAN, L. A; SHIELDS, T.; PINER, L. W.; BALES, C. W.; HOUMARD, J. A.; KRAUS, W. E. Effects of aerobic and/or resistance training on body mass and fat mass in overweight or obese adults. **Journal of applied physiology**, v. 113, n. 12, p. 1831–7, 2012.

WU, J.; BOSTRÖM, P.; SPARKS, L. M.; YE, L.; CHOI, J. H.; GIANG, A-H.; KHANDEKAR, M.; VIRTANEN, K. A.; NUUTILA, P.; SCHAART, G.; HUANG, K.; TU, H.; LICHTENBELT, W. D.; VAN M.; HOEK J.; ENERBÄCK, S.; SCHRAUWEN, P.; SPIEGELMAN B.M. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 366–376, 2012.

ANEXO

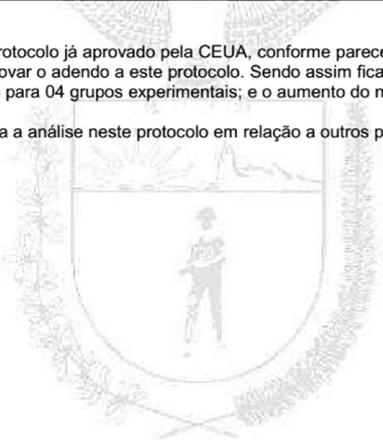
ANEXO I – Parecer de Ética de uso de Animais (CEUA-UEM)



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: 6/11/2014 Parecer nº 148/2014

Pesquisador: Sidney Barnabé Peres	Setor: DFS	
Título:	Protocolo nº 009/2014	
Perfil adipogênico do tecido adiposo branco de camundongos submetidos a diferentes moderações de treinamento.		
Entrada: 19/2/2014	Início: 1/4/2014	Término: 1/3/2016
Situação do Projeto:	Aprovado com Recomendação	
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:		
<p>O pesquisador solicita emenda ao protocolo já aprovado pela CEUA, conforme parecer número 033/2014. Em 20/11/2014 o comitê decidiu aprovar o adendo a este protocolo. Sendo assim fica aprovado a inclusão de mais um grupo experimental, passando de 03 para 04 grupos experimentais; e o aumento do número de animais de 16 para 25 por grupo.</p> <p>Esclarecemos ainda que não é válida a análise neste protocolo em relação a outros protocolos .</p> <p><input type="checkbox"/> É o parecer. S.M.J..</p>		
 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: ceaa@uem.br

ANEXO II - Esteira ergométrica programável (Inbrasport, Porto Alegre) adaptada para acomodar oito ratos simultaneamente, para a realização do treinamento aeróbio.



ANEXO III Aparato de treinamento de força ou resistido (escada).

