

Letícia Maria de Souza Cordeiro

**Adaptações metabólicas induzidas pelo treinamento físico nos
tecidos adiposo e muscular esquelético**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

Letícia Maria de Souza Cordeiro

Adaptações metabólicas induzidas pelo treinamento físico nos tecidos adiposo e muscular esquelético

Tese de doutorado apresentada à banca examinadora designada pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia e Farmacologia) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Executora: Ms. Letícia Maria de Souza Cordeiro

Orientador: Profa. Dra. Leida Maria Botion (ICB/UFMG)

Co-orientadora: Profa. Dra. Danusa Dias Soares (EEFFTO/UFMG)

Belo Horizonte

2012



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia



Tese de doutorado intitulada “**Adaptações metabólicas induzidas pelo treinamento físico nos tecidos adiposo e muscular esquelético**” de autoria da doutoranda Letícia Maria de Souza Cordeiro, defendida em 19 de dezembro de 2012, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e aprovada pela banca examinadora composta pelos professores:

Profa. Dra. Leida Maria Botion
Universidade Federal de Minas Gerais
Orientadora

Departamento de Biofísica e Fisiologia
Instituto de Ciências Biológicas

Profa. Dra. Danusa Dias Soares
Universidade Federal de Minas Gerais
Co-Orientadora

Departamento de Educação Física
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional

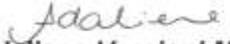
Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira
Universidade de São Paulo/SP

Departamento Educação Física
Escola de Educação Física e esportes



Prof. Dr. Luis Carlos Navegantes
Universidade de São Paulo/SP

Departamento de Fisiologia e Bioquímica
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira
Universidade Federal de Minas Gerais/MG

Departamento de Nutrição
Escola de Enfermagem



Prof. Dr. Samuel Penna Wanner
Universidade Federal de Minas Gerais/MG

Departamento de Educação Física
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2012

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Metabolismo Celular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram concedidos auxílios financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG.

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais (Omar Eustáquio Cordeiro e Maria Clébia de Souza Cordeiro) e ao meu amado marido Tadeu Gonçalves Luckeroth.

Agradecimentos

À população brasileira, que através de esforços possibilita a educação e as pesquisas nas Universidades Federais.

À Deus por renovar minha fé e esperança diariamente.

Aos meus pais Omar Eustáquio Cordeiro e Maria Clébia de Souza Cordeiro que sempre acreditaram nos meus sonhos e me incentivaram incansavelmente para que eles se tornassem realidade, mesmo quando isso significasse abrir mão dos seus próprios sonhos. Obrigada por me carregarem quando minhas pernas ficaram fracas e quando minhas lágrimas caíram, me mostrando que devemos continuar sempre. Minha eterna gratidão e amor!

Ao meu amado marido Tadeu Gonçalves Luckeroth pelo companheirismo, paciência, incentivo, amor e por renovar a minha fé diariamente. Você é minha maior sorte e estar ao seu lado é um incansável despertar: “Quando se ama uma flor da qual só existe um exemplar isso basta para que seja feliz quando a contempla” (Antoine de Saint-Exupéry).

Aos meus amados irmãos Omar Júnior e Sandra e cunhados Luciano e Cristiane pelo amor, paciência, brincadeiras e pelas palavras de incentivo sempre que necessárias. Obrigada pela torcida incansável e por fazerem dos meus dias, dias tão especiais.

A minha outra família, João e Neuza Luckeroth, Joãozinho e Nequinha pelo amor, paciência e pelas palavras de incentivo. Obrigada por todo o carinho que sempre me disponibilizaram.

Aos meus sobrinhos João Pedro, Lucas e Júlia Cordeiro e Jéssica e Pedro Luckeroth, vocês são meu maior incentivo para que eu possa ser uma pessoa melhor todos os dias e, principalmente, me ensinam que aprender é uma arte diária.

À Profa. Dra. Leida Maria Botion meu carinho e gratidão por ter me recebido no Laboratório de Metabolismo e acreditado no projeto, pelas palavras de incentivo constantes e orientação, pelo apoio e confiança em mim depositados. Ninguém entra na vida de ninguém por acaso e, com você aprendi o poder da humanidade nos momentos difíceis que circundam a vida acadêmica.

À Profa. Dra. Danusa Dias Soares do Laboratório de Fisiologia do Exercício pelo carinho, atenção, orientação e por sempre acreditar em mim. Com você tenho aprendido o quão importantes alguns momentos podem significar na vida de alguém e, principalmente, o quão forte podemos ser nos momentos de dificuldades.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira do Laboratório de Fisiologia Renal pelo carinho, atenção, pela liberação do uso da esteira rolante (GAUSTEC) e pelas parcerias nos projetos paralelos, com os quais tenho tido a possibilidade de aprender cada dia mais.

Ao Prof. Dr. Amir de Souza Martins do Laboratório de Biologia Molecular pelo carinho, disponibilidade, atenção e paciência incansável em ensinar a técnica de PCR real time.

Ao prof. Dr. Cândido Celso Coimbra do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo pela atenção, carinho e incentivo constante.

À profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira do Laboratório de Imunometabolismo pelo incentivo constante, palavras motivadoras e exemplo de profissional, bem como pelas sugestões para melhoria do trabalho.

À prof. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do exercício/ USP pela receptividade e carinho que sempre me disponibilizou e, principalmente pela oportunidade de ter realizado as dosagens da citrato sintase no seu laboratório, onde apesar do pouco tempo aprendi muito. Agradeço também a sua aluna Fernanda Roberta Roque pela ajuda e paciência com a dosagem da citrato sintase.

À prof. Dra. Maristela de Oliveira Poleti pelo apoio e torcida com a técnica de western blotting.

As amigas de doutorado e mestrado do Laboratório de Metabolismo Celular Ms. Carolina Campos Lima Moreira, Dra. Érica Mário Guilhen, Ms. Angélica Heringer e Fabíola Cesário (in memória) pelas histórias divididas e pelas discussões acadêmicas que enriqueceram o presente trabalho.

A amiga Dra. Ana Paula Ribeiro pelo incentivo, paciência, disponibilidade e toda a ajuda com o protocolo de treinamento físico dos animais.

Aos iniciações científicas e técnicos Gilbert Douglas Moreira, Bruno Carvalho, Marcos Vinícius Melo Novais, Williane Mendes, Nayara Horta e Esdras Guedes pela ajuda sempre disponibilizada ao Laboratório de Metabolismo Celular e pela convivência.

A Marina Chaves de Oliveira, aluna de mestrado do Laboratório de Imunometabolismo e a Ms. Débora Romualdo pelas análises das citocinas.

Aos funcionários do CEBIO/UFMG pelo cuidado com os animais e a Maria Adelaide Fernandes que sempre procurou atender as solicitações de animais e pelas divertidas conversas e palavras de incentivo.

Às amigas Stela Chamoni Lages, Giuliana Chamoni Lages, Arina Lima, Soraia Cordeiro, Helena Barreto e Izabela Ribeiro pelos anos de amizade e histórias divididas e pela torcida constante para a execução desse projeto. Que nossos caminhos, mesmo que separados pela distância, sigam juntos na mesma direção.

A minha amiga Maria Amélia Cunha Resende pela incansável torcida pelo meu sucesso e pelas histórias divididas. Ao meu amigo Rui Edmar Ribas, eterno professor. Aos meus familiares tio Luciano, tio Gil, tia Eunice, Verinha Cruz e minha avó Maria de Lourdes pela torcida e palavras de incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Exercício, em especial, Dra. Juliana Bohnen Guimarães, Dr. Samuel Penna Wanner, Ms. Michele Macedo Moraes, Ms. Luis Alexandre Barcellos, Ms. Débora Romualdo, Ms. Patrícia Rocha e Ms. Ivana Fonseca pelas constantes histórias divertidas compartilhadas, pelas palavras de incentivo e pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Aos colegas do Laboratório de Eletrocel pelas histórias compartilhadas e pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que essa tese de doutorado fosse realizada.

POESIA

Seja um sonhador

Assim, depois de muito esperar, um dia como qualquer outro decidi triunfar.
Decidi não ficar à espera das oportunidades e fui procurá-las.
Decidi ver cada problema como a oportunidade de encontrar uma solução.
Decidi ver cada deserto como a oportunidade de encontrar um oásis.
Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.
Decidi ver cada dia como a oportunidade de ser Feliz.
Naquele dia descobri que o meu único rival eram apenas as minhas debilidades e
que estas são a única e melhor forma de me superar.
Naquele dia deixei de ter medo de perder e comecei a ter medo de não ganhar.
Descobri que não era o melhor e que talvez nunca o tenha sido.
Deixou de me importar quem ganhara ou quem perdera.
Agora simplesmente me importa ser melhor que ontem.
Aprendi que o difícil não é chegar ao topo, mas sim nunca deixar de subir.
Aprendi que o maior sucesso que posso alcançar
é o ter direito de chamar a alguém de "AMIGO".
Descobri que o amor é mais do que uma simples paixão.
O amor é uma filosofia de vida.
Naquele dia deixei de ser o reflexo dos meus poucos sucessos alcançados e
comecei a ser a minha própria luz do meu presente.
Aprendi de que nada serve ser luz
se não for para iluminar também o caminho da Humanidade.
Naquele dia decidi mudar tanta coisa.
Aprendi que os sonhos são apenas para transformar em realidade
e desde esse dia que não durmo para descansar.
Agora apenas durmo para sonhar.

Walt Disney

Resumo

Palavras chaves: treinamento físico, metabolismo de lipídios e citocinas.

Keywords: lipid metabolism; exercise training; cytokines.

Sumário

SUMÁRIO.....	14
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	19
LISTA DE ABREVIATURAS.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Metabolismo de lipídios.....	24
1.2 Efeito do exercício e treinamento físico na regulação glicídica.....	26
1.3 Vias lipolíticas: adaptações metabólicas induzidas pelo exercício e treinamento físico.....	28
1.4 Citocinas envolvidas no processo de lipólise: efeito do exercício e treinamento físico.....	31
1.5 Influência do exercício e treinamento físico na AMPK, proteína envolvida no processo oxidativo.....	34
1.6 CD36, transportador de ácidos graxos: regulação do exercício e treinamento físico.....	35
1.7 Adaptações metabólicas nos fatores de transcrição e nos genes alvos após o exercício e o treinamento físico.....	37
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1. Animais.....	42
3.2. Cuidados éticos.....	42
3.3. Delineamento experimental.....	42
3.4. Protocolo de familiarização ao exercício de corrida na esteira rolante.....	43
3.5. Protocolo de teste de esforço máximo progressivo.....	44
3.6. Protocolo de treinamento físico.....	45

3.7. Protocolo de exercício físico constante.....	48
3.8. Eutanásia.....	48
3.9. Dosagens das concentrações séricas.....	49
3.10. Determinação da concentração intramuscular de triacilglicerol (IMTG).....	49
3.11. Determinação do glicogênio muscular.....	49
3.12. Determinação da atividade da citrato sintase.....	50
3.13. Extração de citocinas dos tecidos.....	50
3.14. Determinação de citocinas dos tecidos adiposos e muscular.....	50
3.15. Quantificação das proteínas das amostras.....	51
3.16. Western blotting.....	51
3.17. PCR real time.....	52
3.18. Análise estatística.....	53
4 RESULTADOS.....	54
4.1. Variáveis de controle do treinamento físico.....	54
4.2. Variáveis de controle dos grupos experimentais.....	57
4.3. Efeito do treinamento físico no coração.....	59
4.4. Efeito do treinamento físico na atividade da enzima citrato sintase no músculo esquelético.....	60
4.5. Efeito do treinamento físico sobre as reserva de lipídios e carboidratos no músculo esquelético.....	61
4.6. Efeito do treinamento físico nas concentrações de citocinas em diferentes tecidos.....	62
4.7 Respostas moleculares envolvidas na lipólise e oxidação.....	64
4.7.1 Efeito do treinamento físico sobre a expressão protéica da perilipina no tecido adiposo epididimal.....	64
4.7.2 Efeito do treinamento físico na expressão protéica da enzima lipase do triacilglicerol (ATGL).....	66
4.7.3 Efeito do treinamento físico na expressão protéica da enzima lipase hormônio sensível (HSL).....	68
4.7.4 Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm da	

carnitina palmitoil transferase I (CPT-1).....	70
4.7.5 Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm do receptor da ativação da proliferação peroxissomal α (PPAR α)....	71
4.7.6 Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm da acil-CoA oxidase (ACO).....	72
4.7.7 Efeito do treinamento físico sobre o conteúdo protéico da adenosina monofosfato quinase fosforilada (AMPKp).....	73
4.8 Respostas moleculares envolvidas na expressão de genes lipogênicos.....	75
4.8.1 Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm da proteína ligadora do elemento responsivo ao estero1 1c (SREBP-1c).....	75
4.8.2 Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm do receptor da ativação da proliferação peroxissomal γ (PPAR γ).....	77
4.8.3 Efeito do treinamento físico no conteúdo protéica da acetil-CoA carboxilase (ACC).....	79
4.8.4 Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm da tribbles 3 (TRB3).....	81
4.8.5 Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm da acil-CoA sintase (ACS).....	82
4.9. Efeito do treinamento físico na expressão protéica da proteína de transporte de ácido graxo (CD36).....	83
4.10 Efeito do treinamento físico na proteína de transporte de glicose do tipo 4 (GLUT-4) no músculo esquelético.....	85
5 DISCUSSÃO.....	87
6 CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	103
ANEXO.....	111
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA).....	111

Lista de figuras

Figura 1: Grupos experimentais.....	42
Figura 2: Delineamento Experimental.....	43
Figura 3: Protocolo de teste de esforço máximo progressivo (TEMP)....	44
Figura 4.1 - Efeito do treinamento físico no tempo de exercício (min.), na velocidade máxima de corrida ($m \cdot min^{-1}$), na distância percorrida (m) e no trabalho produzido (Kgm) nos testes de esforço máximo.....	56
Figura 4.3 - Efeitos do treinamento físico nos valores do peso do coração relativizado pela massa corporal e no comprimento e largura do coração.....	59
Figura 4.4 - Efeito do treinamento físico na atividade da enzima citrato sintase.....	60
Figura 4.5 - Efeito do treinamento físico nas concentrações de triacilgliceróis e glicogênio intramuscular.....	61
Figura 4.6.1 - Concentração de TNF- α nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e no tecido muscular.....	62
Figura 4.6.2 - Concentração de IL-6 nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e no tecido muscular.....	63
Figura 4.7.1 – Efeito do treinamento físico na quantidade protéica da perilipina no tecido adiposo epididimal.....	65
Figura 4.7.2 - Representa a quantidade protéica da enzima lipase do triacilglicerol no tecido muscular e no tecido adiposo epididimal.....	67
Figura 4.7.3 - Ilustra a quantidade protéica da enzima lipase hormônio sensível no tecido adiposo epididimal.....	69
Figura 4.7.4 - Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm da carnitina palmitoil transferase I (CPT-1).....	70
Figura 4.7.5 - Ilustra a expressão de RNAm do receptor da ativação da proliferação peroxissomal α (PPAR α) nos diferentes tecidos.....	71

Figura 4.7.6 - Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm da Acil- CoA oxidase (ACO).....	72
Figura 4.7.7 - Ilustra a quantidade protéica da adenosina monofosfato quinase fosforilada (AMPKp) no tecido muscular e no tecido adiposo epididimal.....	74
Figura 4.8.1 - Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm do SREBP-1c no tecido muscular e no tecido adiposo epididimal.....	76
Figura 4.8.2 - Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm do PPAR γ no tecido muscular e adiposo.....	78
Figura 4.8.3 - Ilustra a quantidade protéica da acetil-CoA carboxilase (ACC) no tecido muscular e no tecido adiposo epididimal.....	80
Figura 4.8.4 - Ilustra a expressão de RNAm da tribbles 3 (TRB3) nos animais.....	81
Figura 4.8.5 - Efeito do treinamento físico na expressão de RNAm da proteína acil-CoA sintase (ACS).....	82
Figura 4.9 - apresenta a expressão protéica de CD36 no tecido muscular e no tecido adiposo epididimal.....	84
Figura 4.10 - evidencia a quantidade protéica de transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4) no tecido muscular.....	86
Figura 5 - Esquema das alterações metabólicas nos tecidos adiposo e muscular evidenciadas pelo treinamento físico.....	102

Lista de tabelas

Tabela 1 - Programa de treinamento físico.....	47
Tabela 2 - Especificações das proteínas.....	52
Tabela 4.2.1 – Efeito do treinamento físico na massa corporal inicial e final, na variação da massa corporal e no índice de adiposidade.....	57
Tabela 4.2.2 – Efeito do treinamento físico nas variáveis séricas.....	58

Lista de abreviaturas

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACO	Acil-CoA oxidase
ACS	Acetil-CoA sintase
Akt	Proteína quinase B
AMP cíclico ou AMPc	3',5'-monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína adenosina monofosfato quinase
ATGL	Lipase do triacilglicerol
CD36	Proteína de transporte de ácidos graxos
CGI-58	Gene comparativo de identificação 58
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase 1
GLUT-4	Proteína de transporte de glicose-4
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSL	Lipase hormônio sensível
IL-6	Interleucina-6
IMTG	Triacilglicerol intramuscular
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
PDE-3B	Enzima fosfodiesterase 3B
PKA	Proteína quinase A
PPARα	Receptor de ativação da proliferação peroxissomal α

PPARγ	Receptor de ativação da proliferação peroxissomal γ
SREBP-1c	Proteína ligadora do elemento responsivo ao estero1 1c
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAR	Tecido adiposo retroperitoneal
TEMP	Teste de esforço máximo progressivo
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRB3	Pseudoquinase tribbles 3

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos indicam aumento da prevalência da obesidade, a qual é caracterizada pelo aumento do número e do tamanho dos adipócitos, e é resultante do desequilíbrio entre a mobilização e o armazenamento de gordura no tecido adiposo (Zang *et al.*, 2005). O sedentarismo e o consumo abundante de dietas não saudáveis decorrentes do estilo de vida moderno são os principais causadores dessa patologia (Gollisch *et al.*, 2009).

A obesidade é um problema de saúde pública e sua prevalência esta associada ao aumento na incidência de outras condições médicas, tais como diabetes mellitus tipo II e resistência à insulina. A resistência à insulina é uma característica fundamental do diabetes mellitus tipo 2 e é consequente da redução da resposta dos tecidos sensíveis à insulina (Taubes, 2009). Estudos têm sugerido que estas condições estão associadas com desequilíbrios na interação entre os processos metabólicos e imunológicos (imunometabolismo) (Taubes, 2009; Mathis & Shoelson, 2011).

Nos últimos anos, o tecido adiposo não tem sido visto apenas como um mero depósito para os lipídios, mas também como um órgão complexo com funções autócrinas, parácrinas e endócrinas (Gollisch *et al.*, 2009). Na visão clássica da função do tecido adiposo, este tecido garante uma reserva energética de longo prazo, a qual pode ser mobilizada durante períodos de escassez alimentar ou de aumento da demanda metabólica, promovendo a liberação de ácidos graxos para oxidação em outros tecidos. Assim, os estoques de triacilgliceróis no tecido adiposo aumentam em períodos de balanço energético positivo e reduzem quando o gasto energético excede a ingestão alimentar (Trayhurn & Beattie, 2001).

A mudança crítica em relação ao tecido adiposo se deu com a descoberta da leptina, hormônio secretado principalmente pelos adipócitos, com ações tanto centrais (hipotálamo) quanto periféricas, evidenciando o papel do tecido adiposo

na regulação do balanço energético (Zhang *et al.*, 1994). A partir daí, foram identificadas outras proteínas secretadas pelo tecido adiposo, incluindo citocinas, que estão diretamente envolvidas no metabolismo de lipídios (Trayhurn & Beattie, 2001).

Apesar de as causas sociais envolvendo o processo de obesidade serem bastante complexas, dado que a atividade física e o exercício são componentes importantes do gasto energético e, portanto, do balanço energético, é razoável sugerir que a mudança do comportamento físico possa, pelo menos em parte, reverter o quadro de obesidade. Estudos têm evidenciado respostas adaptativas ao treinamento físico no tecido adiposo, como o aumento da atividade de enzimas envolvidas na oxidação de lipídios (Stallknecht *et al.*, 1991; Sutherland *et al.*, 2009). Assim, a partir dessa perspectiva torna-se bastante interessante a compreensão da regulação da massa do tecido adiposo na fisiologia do exercício físico (Thompson *et al.*, 2012).

O músculo esquelético é outro tecido importante por seu papel crítico na homeostase metabólica, sendo que a sua função não se resume apenas pelo seu papel estrutural e de mobilidade (Calvani *et al.*, 2003). O tecido muscular também está envolvido nas respostas metabólicas relacionadas à obesidade. Evidências indicam que o acúmulo excessivo de lipídios no músculo esquelético está associado à resistência à insulina em indivíduos obesos (Forouhi *et al.*, 1999; Kelley *et al.*, 1999) e em indivíduos obesos com diabetes mellitus tipo 2 (Goodpaster *et al.*, 2000).

Tem sido sugerido que concentrações elevadas de lipídios no músculo esquelético de indivíduos obesos estão associadas a taxas reduzidas de oxidação de ácidos graxos por esse tecido, sugerindo que, em obesos sob condições de jejum, o metabolismo do músculo esquelético é mais direcionado à esterificação de ácidos graxos, apresentando uma menor capacidade oxidativa, em função de uma redução na atividade da enzima carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1) (Kelley *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). Esta enzima é fundamental para o transporte

de ácidos graxos de cadeia longa para o interior da mitocôndria onde ocorre a beta oxidação (Calvani *et al.*, 2003).

O aumento da sensibilidade à insulina promovido pelo treinamento físico como resposta adaptativa pode ser consequente de um aumento da capacidade oxidativa de lipídeos no músculo esquelético. A associação entre o acúmulo de lipídios no músculo esquelético e a resistência à insulina pode ser mediada pela capacidade oxidativa de lipídeos nesse tecido (Goodpaster *et al.*, 2001).

A flexibilidade metabólica do músculo esquelético é uma das principais características desse tecido, a qual é expressa por sua alta capacidade em modular as taxas de produção de energia, o fluxo sanguíneo local e a utilização de substratos energéticos a partir de carboidratos ou ácidos graxos (Kelley *et al.*, 1999).

Apesar de os avanços na ciência, até o presente momento, muitos dos mecanismos subjacentes às adaptações do músculo esquelético ao exercício permanecem por serem descobertos (Hamilton & Booth, 2000). Além disso, o efeito do treinamento físico nas adaptações metabólicas no tecido adiposo não está bem estabelecido e possivelmente deve envolver processos complexos de regulação de diferentes enzimas, ativadores e co-ativadores enzimáticos (Vieira & Valentine, 2009).

1.1 Metabolismo de lipídios

O tecido adiposo é a principal fonte de combustível metabólico (Lafontan & Langin, 2009). Os triacilgliceróis estocados nos adipócitos podem ser provenientes da lipogênese *de novo* a partir de precursores não lipídicos ou da captação de ácidos graxos do plasma, liberados dos triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas circulantes pela ação da lipoproteína lipase (Lafontan & Langin, 2009). Por outro lado, o aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados no plasma é

decorrente da hidrólise dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo (Lafontan, 2008). O envolvimento de diferentes fatores na regulação dos estoques de triacilgliceróis é determinante para o acúmulo de lipídios nos diversos depósitos (Lafontan & Langin, 2009).

A insulina desempenha um papel importante no processo lipogênico, por aumentar a translocação de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT-4) para a membrana nas células adiposas, aumentando dessa forma a captação de glicose (Kersten, 2001). A regulação da lipogênese também se dá pela ação de fatores de transcrição, incluindo o receptor de ativação da proliferação peroxissomal (PPAR) - γ (Mandard *et al.*, 2004) e a proteína ligadora do elemento responsivo ao esteroide 1c (SREBP-1c) (Ikeda *et al.*, 2002) que ativam a transcrição gênica de enzimas envolvidas nesse processo metabólico.

Já no estado de jejum ou durante o exercício físico moderado, ocorre o desvio do metabolismo energético da utilização da fonte de glicose e lipídios para a utilização predominante de lipídios. As catecolaminas constituem os principais estimulantes endógenos do processo lipolítico, através de seus efeitos sobre a atividade das enzimas envolvidas na hidrólise dos triacilgliceróis armazenados nos vários sítios de tecido adiposo. A insulina, por outro lado, inibe esse processo, uma vez que a interação desse hormônio com o receptor específico, ativa a enzima fosfodiesterase 3B (PDE-3B) que aumenta a hidrólise de 3',5'-monofosfato de adenosina (AMPC), reduzindo conseqüentemente a fosforilação da proteína quinase A (PKA) e da enzima lipase hormônio sensível (HSL) (Lafontan & Langin, 2009). Outro fator importante no aumento da disponibilidade de ácidos graxos para a circulação é o envolvimento de proteínas transportadoras de ácidos graxos (Su & Abumrad, 2009).

1.2 Efeito do exercício e treinamento físico na regulação glicídica

Nos tecidos sensíveis à insulina, a redução da resposta a esse hormônio promove como resposta compensatória o aumento da secreção desse hormônio pelo pâncreas, podendo contribuir gradualmente para o desenvolvimento da resistência dos tecidos sensíveis à insulina (Taubes, 2009). Os mecanismos envolvidos nessa resposta ainda não estão totalmente elucidados, no entanto, uma das possibilidades seria o acúmulo de lipídios nos tecidos muscular e hepático, produzindo conseqüentemente lipotoxicidade nestas células. Outro mecanismo sugerido está relacionado à hipótese inflamatória, uma vez que o aumento de deposição de triacilgliceróis nos adipócitos estimula a secreção de adipocinas, as quais interferem na via de sinalização da insulina (Taubes, 2009). O terceiro fator sugerido está relacionado ao aumento do conteúdo protéico de tribbles 3 (TRB3). A pseudoquinase TRB3 é um gene induzível, cuja expressão é modulada por estresse metabólico (Ohoka *et al.*, 2005) e pela insulina (Matsumoto *et al.*, 2006). Foi verificado que a proteína TRB3 medeia a degradação da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) e, bloqueia especificamente as ações da insulina ao se ligar e inativar a proteína quinase B (AKT) (Du *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2009). A inibição da ACC diminui a concentração de malonil-CoA removendo, desta forma, a inibição da CPT-1 por este substrato, conseqüentemente estimulando a oxidação de ácidos graxos. Em casos onde há um quadro de resistência à insulina, como por exemplo, na obesidade, verifica-se um aumento na expressão da TRB3 no tecido adiposo e, este aumento pode estar relacionado com a resistência à insulina por inibir a ação da AKT (Bi *et al.*, 2008).

O treinamento físico em indivíduos obesos, associado ou não a dietas de restrição calórica desencadeia respostas benéficas em parâmetros plasmáticos, como colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e de baixa densidade (LDL), triacilgliceróis, glicose e insulina (Francischi *et al.*, 2001).

Com relação à melhoria na homeostase da glicose promovida pelo treinamento físico, numerosos fatores metabólicos e hemodinâmicos podem contribuir para essa resposta. Dentre as diversas respostas adaptativas são descritas: o aumento na ação da insulina no sistema de transporte de glicose (GLUT-4) no músculo esquelético, a redução da produção de glicose hepática, a melhora do fluxo sanguíneo no músculo esquelético e a normalização das concentrações lipídicas (Henriksen, 2002).

A translocação do GLUT-4 também ocorre como consequência da contração muscular durante o exercício físico agudo, independente da ação da insulina, mediando o transporte de glicose para o interior das células musculares (Holloszy, 2008). Em estudo prévio foi verificado o efeito adaptativo do treinamento físico no aumento na quantidade da proteína GLUT-4 (Friedman *et al.*, 1990). Nesse estudo os autores verificaram que ratos *Zucker* jovens, obesos e, intolerantes à glicose, apresentaram aumento na quantidade da proteína de transporte GLUT-4 quando submetidos à corrida na esteira rolante em intensidade moderada por 18 ou 30 semanas (Friedman *et al.*, 1990). Desde então, diversos estudos tem sugerido que a melhora na sensibilidade à insulina e, conseqüentemente, do perfil glicídico com o treinamento físico é associada a aumento na expressão (Friedman *et al.*, 1990; Kranjou *et al.*, 2004) e na translocação do GLUT-4 para a superfície da membrana (Etgen *et al.*, 1997).

Com relação ao TRB3, ainda não está claro qual o efeito do exercício e do treinamento físico sobre a expressão desta proteína. Foi observado que o exercício físico agudo de natação durante 2 h reduziu a expressão protéica de TRB3 no fígado promovendo melhora na sensibilidade à insulina em camundongos *knockout* para leptina (*ob/ob*) e em camundongos com obesidade induzida por dieta (Lima *et al.*, 2009). Além disso, o mesmo protocolo de exercício em camundongos *ob/ob*, diabéticos, reduziu a expressão protéica de TRB3 no músculo gastrocnêmico, restaurando a via de sinalização da insulina, possivelmente por um aumento na captação de glicose pelo tecido muscular (Matos *et al.*, 2010). A redução da expressão protéica de TRB3 e aumento da

ação da insulina no fígado também foi verificada em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, após treinamento físico de natação durante 60 min, 5 vezes por semana durante 8 semanas, mesmo sem modificação no peso corporal (Marinho *et al.*, 2012).

1.3 Vias lipolíticas: adaptações metabólicas induzidas pelo exercício agudo e treinamento físico.

O aumento da demanda energética durante exercício físico prolongado, no estado alimentado, é suprido, em parte, pelo aumento da hidrólise dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo (Horowitz, 2003). Assim sendo, uma maquinaria complexa envolvendo a lipólise no tecido adiposo e sua interação com o músculo esquelético é necessária para o fornecimento de energia durante o exercício físico (Jeon & Kim, 2012).

No início do exercício, ocorre aumento na secreção e liberação de catecolaminas circulantes, as quais se ligam a receptores do tipo β 3-adrenérgicos na superfície da membrana dos adipócitos. A ativação do segundo mensageiro pelo ligante (catecolaminas) ao receptor não é direta, sendo mediada pela proteína G trimétrica. A proteína G dissocia-se em uma subunidade α e um dímero $\beta\gamma$, sendo que a subunidade α ligada ao receptor ativado (GTP) move-se do receptor para a adenilato-ciclase, ativando essa enzima, a qual catalisa a conversão de ATP em AMPc. Em seguida, o AMPc ativa a PKA, a qual catalisa a transferência de fosfato do ATP para proteínas específicas, como as perilipinas e a enzima HSL.

A proteína perilipina, localizada na superfície da gotícula lipídica, em condições basais funciona como uma barreira que restringe o acesso das lipases aos triacilgliceróis, regulando o processo lipolítico. Essa proteína quando fosforilada pela ação da PKA estimula a lipólise, facilitando a translocação da HSL

e permitindo o acesso dessa enzima aos triacilgliceróis (Kraemer & Shen, 2006; Jeon & Kim, 2012). Em estudo realizado em 2001, foi demonstrado que animais *knockout* para perilipinas ($peri^{-/-}$) apresentaram resistência ao desenvolvimento da obesidade induzida por tratamento com dieta hiperlipídica em consequência de um aumento da lipólise basal resultante da ausência da perilipina (Tansey *et al.*, 2001). Recentemente, foi observado que camundongos $peri^{-/-}$ não apresentaram redução no desempenho físico, contudo, apresentaram aumento da oxidação de ácidos graxos (Beylot *et al.*, 2012).

O efeito do treinamento físico nessa proteína ainda não está totalmente elucidado. O treinamento de corrida em intensidade moderada, durante o período de 2 a 8 semanas, em animais alimentados com dieta rica em lipídios, não promoveu modificações na quantidade de perilipina (Chapados *et al.*, 2008).

Além da atividade da HSL, outra enzima, a lipase de triacilgliceróis (ATGL) também desempenha papel importante na hidrólise dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo (Yen & Farese, 2006). Foi observado em camundongos *knockout* para HSL ($HSL^{-/-}$) um acúmulo de diacilgliceróis, sugerindo o requerimento de uma enzima alternativa para a hidrólise dos triacilgliceróis (Watt, 2009). Ao contrário da HSL, a ATGL não se transloca para a gotícula lipídica pela estimulação adrenérgica e, é ativada pela ação da proteína gene comparativo de identificação 58 (CGI-58), que se encontra associada à perilipina. A disfunção da CGI-5 resulta em acúmulo sistêmico de triacilgliceróis em estudo com camundongos (Lass *et al.*, 2011). Assim, quando ocorre a fosforilação da perilipina, a CGI-58 é liberada e interage com a ATGL, tornando essa enzima ativa (Zimmermann *et al.*, 2004). A ausência da enzima ATGL em camundongos ($ATGL^{-/-}$) impede o ajuste das concentrações de ácidos graxos circulantes para atender ao aumento do requerimento energético do músculo ativo durante o exercício, resultando num aumento do uso de carboidratos para a conversão em energia (Schoiswohl *et al.*, 2010). Ainda segundo estes autores, foi observado que nos camundongos $ATGL^{-/-}$ o desempenho físico reduziu em 46%, sendo que o mesmo não foi modificado nos animais $HSL^{-/-}$. Essa resposta pode ter

se dado em função da redução dos estoques de carboidratos previamente ao exercício físico sendo que, nos animais HSL^{-/-}, a lipólise parcial de triacilgliceróis do tecido adiposo e do músculo foi suficiente para manter o desempenho físico e possivelmente uma melhor manutenção dos estoques de glicogênio muscular em comparação com os camundongos ATGL^{-/-} (Schoiswohl *et al.*, 2010). O resultado de outro estudo utilizando camundongos HSL^{-/-} demonstrou redução no desempenho físico destes animais em corrida na esteira rolante, com aumento progressivo da velocidade até a fadiga. Além disso, foi observada redução na concentração de glicogênio hepático no mesmo tempo de exercício (25 minutos) (Fernandez *et al.*, 2008).

Os resultados de estudos da última década sugerem que a ATGL e a HSL possuem preferências por diferentes substratos dentro da cascata lipolítica (Zimmermann *et al.*, 2004). Portanto, estes novos achados propõem, numa visão atual, que a ATGL e a HSL atuam de forma hierárquica regulando a hidrólise de triacilgliceróis: ATGL inicia a lipólise pela remoção do primeiro ácido graxo do triacilglicerol, produzindo o diacilglicerol, o qual então é hidrolisado a monoacilglicerol pela ação da HSL, gerando um ácido graxo adicional e o monoacilglicerol, o qual é convertido a ácido graxo e glicerol pela ação da enzima monoacilglicerol lipase (Watt, 2009; Zechner *et al.*, 2012).

Em estudo realizado com camundongos submetidos a treinamento de corrida na esteira rolante durante 5 semanas, numa velocidade de 16 m.min⁻¹ (5% de inclinação) observou-se redução na expressão protéica da ATGL no músculo esquelético, enquanto a expressão protéica dessa enzima não foi modificada no tecido adiposo. Além disso, a expressão protéica da HSL também não foi diferente no músculo esquelético e no tecido adiposo entre os animais treinados e sedentários (Huijsman *et al.*, 2009).

1.4 Citocinas envolvidas no processo de lipólise: efeito do exercício agudo e treinamento físico

Além da participação de enzimas no processo lipolítico foi verificado que algumas citocinas inflamatórias são capazes de modular esta atividade tanto no tecido adiposo (Botion *et al.*, 2001; Langin & Arner, 2006), quanto no músculo esquelético (Pedersen & Febbraio, 2012).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina multifuncional que regula muitos processos biológicos e celulares, como função imune, diferenciação celular, proliferação, apoptose e metabolismo energético (Cawthorn & Sethi, 2008). Essa citocina tem sido alvo de interesse dos estudos sobre a regulação dos estoques de lipídios no tecido adiposo, uma vez que originalmente foi relacionada ao processo de caquexia. Em estudo preliminar, foi sugerida a ação do TNF- α , até então denominado caquetina, como mediador do aumento do catabolismo observado em pacientes ou animais submetidos a vários estímulos invasivos, tais como infecções (Kawakami *et al.*, 1987). Além disso, essa citocina parece inibir a diferenciação dos adipócitos e a lipogênese em experimentos *in vitro* (Torti *et al.*, 1985).

Tem sido sugerido alguns possíveis mecanismos pelos quais o TNF- α poderia modular o processo de lipólise. Um deles é pela ação inibitória dessa citocina na sinalização do receptor de insulina, conseqüentemente, bloqueando o efeito antilipolítico desse hormônio. A inibição da sinalização da insulina mediada pelo TNF- α reduz a concentração da PDE-3B, resultando na redução da degradação do AMPc. Outro mecanismo sugerido se dá a partir da “down-regulation” da proteína G inibitória, resultado em aumento da atividade da adenilato ciclase e conseqüente geração de AMPc. O terceiro mecanismo sugerido é a estimulação direta da lipólise basal através da interação com a proteína perilipina, aumentando a sua fosforilação ou reduzindo a sua expressão,

no entanto, sem haver qualquer efeito na regulação da expressão das lipases nos adipócitos (Langin & Arner, 2006).

Outra citocina que tem sido alvo de muitos estudos é a interleucina-6 (IL-6). Em experimento realizado com camundongos *knockout* para a IL-6^{-/-}, foi observado o desenvolvimento precoce da obesidade (Wallenius *et al.*, 2002). Em outro estudo, a infusão de IL-6 em voluntários saudáveis induziu aumento na lipólise, sem modificação nas concentrações arteriais de catecolaminas, glucagon e insulina (van Hall *et al.*, 2003). Segundo estes autores, a IL-6 é um potente modulador do metabolismo de lipídios, aumentando a oxidação e reduzindo a esterificação de ácidos graxos, sem causar hipertriacilgliceridemia (van Hall *et al.*, 2003).

A estimulação da atividade da proteína adenosina monofosfato quinase (AMPK) parece ser a via pela qual a IL-6 ativa o processo de oxidação, uma vez que em estudo realizado com camundongos IL6^{-/-}, foi observado redução na fosforilação da AMPK no músculo esquelético e no tecido adiposo (Kelly *et al.*, 2004).

Uma vez que o exercício físico promove diversos ajustes metabólicos, não seria surpresa se também ocorresse o aumento da secreção de citocinas, dentre elas o TNF- α e a IL-6 (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Diversos estudos têm demonstrado aumentos na concentração plasmática de IL-6 após o exercício (Drenth *et al.*, 1995), porém, com relação ao TNF- α , os resultados ainda são controversos (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Atletas submetidos a 6 h de corrida apresentaram ao final do exercício aumento na concentração plasmática de IL-6; no entanto, nenhuma diferença foi observada na concentração de TNF- α (Drenth *et al.*, 1995). Em outro estudo, corredores com alto condicionamento físico submetidos a 5 Km de corrida apresentaram aumento da concentração plasmática de TNF- α , 2 h após o término do exercício, com o retorno dessas concentrações aos valores basais sendo verificado após 24 horas (Espersen *et al.*, 1990).

Inicialmente, acreditava-se que o aumento nas concentrações de citocinas induzido pelo exercício ocorria devido a danos musculares que desencadeavam uma resposta imune (Steensberg *et al.*, 2002). Essa ideia foi embasada por resultados de uma investigação anterior, na qual indivíduos saudáveis foram submetidos a exercício de alta intensidade em bicicleta e realizaram dois testes diferentes (Bruunsgaard *et al.*, 1997). O primeiro teste consistiu de 30 min de exercício pedalando normalmente (exercício concêntrico), enquanto, o segundo teste, também com duração de 30 minutos, consistia em pedalar contra uma resistência na bicicleta na rotação inversa (exercício excêntrico). Os resultados desse estudo mostraram aumento mais acentuado na concentração plasmática de IL-6 no exercício excêntrico em relação ao concêntrico (Bruunsgaard *et al.*, 1997). Contudo, os resultados de outro estudo contradizem essa hipótese, pois indivíduos altamente capacitados fisicamente após corrida de maratona (aproximadamente 169 minutos) não apresentaram aumento na quantidade de monócitos circulantes, mesmo com o aumento na concentração de IL-6 e TNF- α , evidenciando que os monócitos circulantes não foram a origem destas citocinas (Starkie *et al.*, 2001).

O aumento na concentração de IL-6 no tecido adiposo subcutâneo, 30 min após o término do exercício foi demonstrado em estudo utilizando homens que realizaram exercício no cicloergômetro durante 1 h em uma intensidade de moderada (Lyngso *et al.*, 2002). Segundo estes autores, o aumento da produção de IL-6 pós-exercício no tecido adiposo subcutâneo sugere que essa citocina pode atuar localmente via mecanismos autócrinos e/ou parácrinos, influenciando a lipólise e a taxa de mobilização de ácidos graxos dos depósitos de lipídios. Em outro estudo, ratos foram submetidos a exercício de corrida na esteira rolante a 20 m.min⁻¹ durante 50 minutos, em seguida, a velocidade foi progressivamente aumentada (1 m.min⁻¹ a cada 1 minuto) até que o animal alcançasse a fadiga e, foi verificado aumento na expressão protéica de IL-6 e TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico, bem como no músculo sóleo e extensor posterior da perna, imediatamente depois do exercício e até 6 horas depois de o mesmo ter sido encerrado (Neto *et al.*, 2009).

A influencia do treinamento físico sobre a expressão de citocinas nos diferentes tecidos foi demonstrado em animais treinados durante 4 semanas em exercício voluntário na roda que apresentaram aumento na expressão de RNAm de IL-6 e TNF- α no tecido adiposo subcutâneo, apesar de não ter sido detectado aumento nas concentrações séricas destas citocinas (Gollisch *et al.*, 2009). Enquanto que, o treinamento físico de corrida na esteira rolante em ratos, durante 7 semanas, com intensidade progressivamente aumentada até que os animais nas duas últimas semanas corressem a 25 m.min⁻¹, 7° de inclinação durante 2 horas, 5 dias por semana, não promoveu mudanças nas concentrações de IL-6 no tecido adiposo retroperitoneal e no músculo esquelético (Gomez-Merino *et al.*, 2007).

1.5 Influencia do exercício e treinamento físico na AMPK, proteína envolvida no processo oxidativo.

Os mecanismos envolvidos no metabolismo de lipídios são bem complexos. Além das diversas proteínas envolvidas no processo lipolítico, outras proteínas são relacionadas direta ou indiretamente ao aumento na oxidação de lipídios e na captação de ácidos graxos, bem como no processo de lipogênese.

A AMPK tem sido descrita como um sensor metabólico que detecta baixas concentrações de ATP, tais como as que ocorrem durante o exercício (Mu *et al.*, 2001). As alterações metabólicas no músculo esquelético induzidas pela ativação da AMPK podem ser agudas, através da fosforilação de enzimas metabólicas, ou crônicas, através do controle da expressão gênica (Hardie & Sakamoto, 2006).

A fosforilação da AMPK induzida pela contração muscular reduz a concentração de malonil-CoA no músculo (Richter & Ruderman, 2009) e no tecido adiposo (Park *et al.*, 2002) devido à fosforilação e consequente inibição da enzima ACC. A ACC na forma não fosforilada (ativa) é responsável pela produção do metabólito malonil-CoA, inibidor da captação mitocondrial de ácidos graxos

através da CPT-1 e, conseqüentemente, do aumento da oxidação (Hardie & Sakamoto, 2006; Richter & Ruderman, 2009). Em estudo anterior, foi verificado que ratos submetidos a 6 h de exercício de natação em baixa intensidade apresentaram aumento na atividade da AMPK no tecido muscular (Terada *et al.*, 2002). Assim, parece que a AMPK pode ser o sensor que detecta os mecanismos envolvidos no déficit da capacidade oxidativa e, que estimula a biogênese mitocondrial (Hardie & Sakamoto, 2006). A AMPK pode também regular a captação de glicose no músculo aumentando a translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática, por fosforilar o substrato da AKT (AS160) no mesmo sítio que a insulina, indicando uma interseção da regulação dos mecanismos de regulação da captação de glicose pela AMPK e insulina (Hardie, 2007; Richter & Ruderman, 2009).

1.6 CD36, transportador de ácidos graxos: regulação do exercício e treinamento físico.

As proteínas de transporte também influenciam o metabolismo energético. Tem sido reconhecida a participação de proteínas de transporte auxiliando a passagem de ácidos graxos de cadeia longa através da membrana plasmática, mudando os conceitos anteriores de que essa passagem se dava exclusivamente por difusão passiva (Nickerson *et al.*, 2009).

A proteína de transporte CD36, que apresenta expressão abundante de RNAm no músculo esquelético e cardíaco e no tecido adiposo, regula a captação de ácidos graxos através da membrana plasmática e o subsequente metabolismo desse substrato (Bonen *et al.*, 2004). A expressão aumentada de CD36 no tecido muscular em camundongos transgênicos aumentou a capacidade de captação e oxidação de ácidos graxos circulante, com redução da disponibilidade de ácidos graxos para a síntese hepática de triacilgliceróis, acompanhada de redução no peso corporal dos animais (Ibrahimi *et al.*, 1999). Já a ausência do transportador

CD36 em camundongos *knockout* (CD36^{-/-}), em condições basais, reduziu o metabolismo do ácido palmítico (Bonen *et al.*, 2007).

Assim como o GLUT 4, a proteína de transporte CD36 encontra-se localizada no sarcolema, e a sua translocação para membrana plasmática é estimulada pela contração muscular (Bonen *et al.*, 2000) e pela ação da insulina (Luiken *et al.*, 2002). Além de se translocar para a membrana plasmática, a CD36 também pode se deslocar do sarcolema ou mesmo da membrana plasmática para a mitocôndria, auxiliando na passagem dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria juntamente com a CPT-1, justificando o aumento acelerado da oxidação durante o exercício (Campbell *et al.*, 2004). Segundo estes autores, o aumento da taxa de oxidação de ácidos graxos induzido por estimulação elétrica crônica do músculo (24 h durante 7 dias) promoveu aumento na expressão de proteína CD36 na mitocôndria, enquanto a estimulação elétrica aguda (30 min) promoveu aumento da translocação de CD36 para a membrana mitocondrial. O mecanismo exato pelo qual essa translocação induzida pela contração muscular se dá ainda não está totalmente elucidado, contudo tem sido sugerido o envolvimento da AMPK nessa resposta (Luiken *et al.*, 2003; Richter & Ruderman, 2009).

O exercício físico promoveu o aumento da expressão de RNAm da CD36 em indivíduos não treinados que foram submetidos a um exercício moderado em cicloergômetro durante 90 min, contudo nesse estudo não foi verificada diferença na expressão de RNAm e de proteína da CD36 entre indivíduos treinados e não treinados (Kiens *et al.*, 2004). Essa resposta foi contrária à observada em investigação, na qual os autores verificaram que o exercício agudo realizado antes e depois do treinamento não modificou a expressão de RNAm da CD36, enquanto que o treinamento físico realizado durante 9 dias consecutivos, 1 h por dia, promoveu aumento da expressão de RNAm da CD36 (Tunstall *et al.*, 2002).

1.7 Adaptações metabólicas nos fatores de transcrição e nos genes alvos após o exercício e o treinamento físico.

Os PPARs são fatores de transcrição que regulam a transcrição de genes alvos em resposta a ligantes específicos. Inicialmente o PPAR forma um heterodímero a partir da associação com diversos receptores hormonais nucleares, como o receptor do ácido retinóico X (PPAR:RXR). Em seguida, liga-se a uma sequência específica da região promotora do gene alvo. A ligação com o ligante em um ou mesmo dois receptores ativa o complexo, estimulando ou inibindo a expressão gênica (Kersten *et al.*, 2000; Mandard *et al.*, 2004).

O PPAR α é altamente expresso em tecidos que oxidam ácidos graxos, como o fígado, o tecido adiposo marrom e o músculo esquelético (Kersten *et al.*, 2000). O PPAR α regula a entrada de ácidos graxos na mitocôndria, através do aumento da expressão do gene da enzima CPT-1. Além disso, esse fator de transcrição possivelmente aumenta a atividade da enzima transportadora CPT-1 devido à indução da degradação de malonil-CoA a acetil-CoA mediada pela ação da enzima malonil-CoA descarboxilase (Mandard *et al.*, 2004). A oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa também é influenciada pelo PPAR α através da regulação da expressão de genes envolvidos na β -oxidação peroxisomal. A enzima acil-CoA oxidase (ACO) é um gene alvo do PPAR α que catalisa o primeiro passo da oxidação peroxisomal (Mandard *et al.*, 2004).

Estudos prévios do Laboratório de Metabolismo Celular mostram que o tratamento de ratos com fenofibrato, agonista do PPAR α , reduz a deposição lipídica no fígado através de aumento da expressão de RNAm deste fator de transcrição e de sua enzima alvo ACO (Ferreira *et al.*, 2008). Nesse estudo também foi verificada redução do peso corporal e dos estoques de tecido adiposo e, segundo os autores, essa resposta pode ter ocorrido em função do aumento na expressão de RNAm do PPAR α e da ACO nesse tecido. Estes resultados indicam

a regulação importante desse fator de transcrição e dos seus genes alvos na regulação do metabolismo de lipídios (Ferreira *et al.*, 2008).

O efeito do exercício e do treinamento físico no PPAR α ainda não está totalmente elucidado. Em indivíduos submetidos a exercício agudo de intensidade moderada no cicloergômetro durante 60 min, antes e depois do treinamento físico, não foi verificada diferença na expressão de RNAm do PPAR α (Tunstall *et al.*, 2002).

O PPAR γ é outro fator de transcrição que influencia os estoques de triacilgliceróis do tecido adiposo, onde é mais expresso, e é regulado por fatores nutricionais e por citocinas (Bogacka *et al.*, 2004). Esse fator de transcrição parece estar envolvido na adipogênese, no processo de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros e na lipogênese, descrita como o processo de síntese e armazenamento de triacilgliceróis (Kersten *et al.*, 2000). O PPAR γ também parece ter importante papel na sensibilidade à insulina (Hammarstedt *et al.*, 2005). Segundo estudo prévio, a ativação do PPAR γ no tecido adiposo melhora a capacidade de síntese dos estoques de lipídios, através da ativação de genes que codificam as enzimas lipogênicas, resultando no aumento de triacilgliceróis no tecido adiposo e redução das concentrações de ácidos graxos livres e triacilgliceróis no sangue, fígado e músculo, contribuindo também para a melhora na sensibilidade à insulina (Evans *et al.*, 2004).

O SREBP-1c também medeia o processo de lipogênese, a partir do estímulo de vários nutrientes e hormônios, como a insulina (Mandard & Kersten, 2006). Depois de ser sintetizado, esse fator de transcrição encontra-se localizado na membrana do retículo endoplasmático como proteína de membrana, associado à proteína de ativação de clivagem do SREBP-1c (SCAP). Quando estimulada, como em baixas concentrações de colesterol, o SREBP-1c se move na vesícula para o complexo de golgi com a ajuda da SCAP, onde sequencialmente é clivado por duas proteases (S1P e S2P). No complexo de golgi, a S1P cliva os segmentos de ligação do SREBP-1c, sendo que o domínio N terminal é liberado da membrana pela ação da S2P. Já no citoplasma, o domínio N terminal interage

com a importina β , uma proteína nuclear de transporte, e é então carregado para o núcleo. Em seguida, o SREBP-1c se desacopla da importina β e regula a transcrição de genes a partir da interação com proteínas nucleares (Sato, 2009).

Tem sido sugerida a associação entre SREBP-1c e o PPAR γ na regulação do processo de adipogênese e lipogênese, uma vez que este fator de transcrição é gene alvo do PPAR γ . Além disso, o SREBP-1c também estimula a atividade do PPAR γ pela produção de ligantes endógenos (Mandard & Kersten, 2006). Essa influência no processo lipogênico se dá pelo controle transcricional de genes, envolvendo enzimas importantes nesse processo, como a enzima acetil-CoA sintase (ACS), responsável pela formação de acetil-CoA para posterior esterificação a triacilglicerol, e a enzima ACC, responsável pela conversão da acetil-CoA a malonil-CoA (Kersten *et al.*, 2000).

O efeito do exercício e do treinamento físico na expressão de RNAm, de proteína e na atividade destes fatores de transcrição não está totalmente elucidado. Em estudo anterior, o exercício físico no ciclo ergômetro durante 60 min não modificou a expressão de RNAm do SREBP-1c no tecido muscular, contudo, reduziu a expressão de RNAm do PPAR γ (Tunstall *et al.*, 2002). Essa resposta também foi observada após o treinamento físico de intensidade moderada durante 9 dias (Tunstall *et al.*, 2002). Já em outra investigação, o treinamento de corrida voluntária na roda durante 8 semanas, não modificou a expressão de PPAR γ no tecido muscular e no tecido adiposo epididimal, contudo a atividade desse fator de transcrição foi maior no tecido adiposo (Petridou *et al.*, 2007).

A expressão de RNAm de SREBP-1c no músculo gastrocnêmico após corrida na esteira rolante durante 1 h a 15 m.min⁻¹ (10% de inclinação) não foi modificada imediatamente depois e nas 24 h subsequentes aos término do exercício. Entretanto, essa expressão de RNAm de SREBP-1c foi aumentada, 12 h após um exercício de corrida de 6 h na esteira rolante a 15 m.min⁻¹ (10% de inclinação) (Ikeda *et al.*, 2002).

O treinamento físico de natação durante 8 semanas aumentou a expressão de RNAm de SREBP-1c no músculo gastrocnêmico e quadríceps, 3 h após a última sessão de exercício e esse aumento se manteve até 22 h após o término do exercício (Ikeda *et al.*, 2002). Além disso, a expressão de RNAm do seu gene alvo ACC também foi aumentada no músculo gastrocnêmico 3 h depois da última sessão de exercício, sendo que a sua expressão já havia retornado aos valores basais 22 h depois do término do exercício. Já no quadríceps, o aumento na expressão de RNAm de ACC também foi observado e se manteve até 22 horas após a última sessão de exercício (Ikeda *et al.*, 2002).

A ACC também é regulada pela TRB3, a qual apresenta papel chave na regulação metabólica, uma vez que medeia a degradação dessa enzima chave no processo de lipogênese (Neels & Olefsky, 2006). Segundo estes autores, essa proteína medeia a interação entre a ACC e a proteína constitutiva fotomorfogênica 1 (COP-1), desencadeando a ubiquitinação e, subsequente degradação da enzima.

Animais transgênicos que superexpressam o TRB3 no tecido adiposo apresentam ingestão calórica elevada e aumento na oxidação de ácidos graxos, acompanhado de redução no ganho de massa corporal (Neels & Olefsky, 2006). Estes resultados sugerem que o TRB3 quando aumentado, como ocorre durante situações de jejum, desvia o metabolismo energético do processo lipogênico para o processo lipolítico (Neels & Olefsky, 2006).

Diversas pesquisas tem investigado o efeito do treinamento físico nas adaptações musculares, contudo muitas respostas ainda estão por serem estabelecidas, principalmente envolvendo exercício de alta intensidade e o metabolismo de lipídios. Além disso, o efeito do treinamento físico nas adaptações metabólicas no tecido adiposo é um campo promissor e pode contribuir para estudos com o objetivo de reversão do quadro de obesidade. Essa é uma linha de investigação ainda nova e os mecanismos envolvidos nestas respostas não estão completamente elucidados.

Este estudo investigou as respostas adaptativas relacionadas ao metabolismo de lipídios nos tecidos adiposo e muscular induzidas pelo treinamento físico de alta intensidade e o envolvimento das citocinas nestas respostas.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as alterações induzidas pelo treinamento físico de alta intensidade sobre as concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total, ácidos graxos livres, glicose, insulina e corticosterona;
- Determinar as alterações induzidas pelo treinamento físico de alta intensidade sobre as expressões de citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-6 nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e muscular (gastrocnêmico);
- Estabelecer as respostas produzidas pelo treinamento físico de alta intensidade sobre a expressão de genes que codificam enzimas lipogênicas nos tecidos muscular esquelético e adiposo epididimal;
- Avaliar os efeitos do treinamento físico de alta intensidade na quantidade protéica de enzimas lipolíticas e na expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na oxidação de lipídios nos tecidos muscular esquelético e adiposo epididimal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* (*Mus norvegicus albinis*), pesando aproximadamente 200 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os animais foram mantidos coletivamente em caixas de polietileno em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob um ciclo claro-escuro de 13:11 horas, sendo as luzes acesas às 6h e apagadas às 19h, com livre acesso à ração granulada e água.

3.2. Cuidados éticos

Todos os procedimentos utilizados no presente estudo obedeceram aos Princípios Éticos da Experimentação Animal estabelecidos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais. O protocolo experimental foi aprovado pelo CETEA (anexo 1; nº 29/2009).

3.3. Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupo controle e grupo treinado.

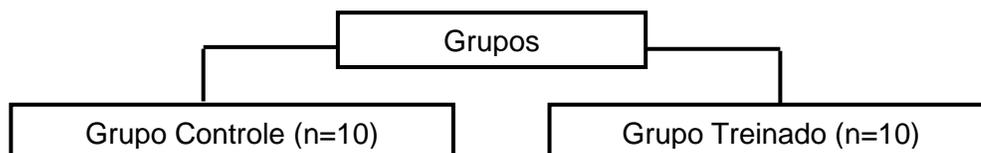


Figura 1: Grupos experimentais

Os animais foram submetidos ao protocolo experimental descrito no texto que se segue e ilustrado na linha do tempo abaixo.

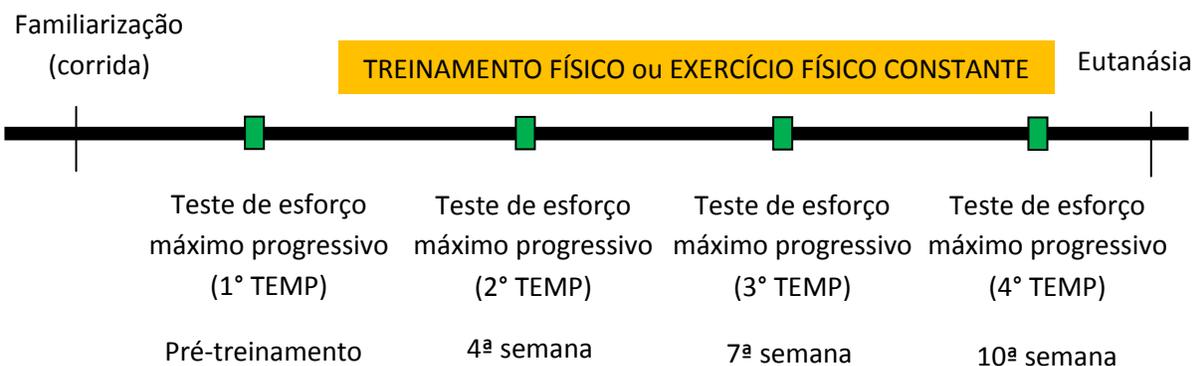


Figura 2: Delineamento Experimental

3.4. Protocolo de familiarização ao exercício de corrida na esteira rolante

Os animais foram submetidos a um exercício de corrida em esteira rolante para animais de pequeno porte (Gaustec, Contagem, MG, Brasil), durante quatro dias consecutivos por 5 minutos, uma semana antes do protocolo experimental, numa velocidade constante de $18 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ e 5% de inclinação, sob estimulação elétrica (0,5 mA; 2,5 mV) (Sonne & Galbo, 1980). A familiarização foi realizada para que os animais aprendessem a correr na direção correta garantindo um desempenho mais eficiente na esteira.

3.5. Protocolo de teste de esforço máximo progressivo

Os animais do grupo controle e do grupo treinado foram submetidos aos testes de esforço máximo progressivo (TEMP) possibilitando ao longo do período de treinamento físico a comparação entre os grupos, do tempo de exercício, da velocidade máxima de corrida, do trabalho produzido e da distância percorrida para a verificação do efeito do treinamento. Além disso, no grupo treinado os TEMPs possibilitaram o ajuste da velocidade máxima de corrida ao longo do protocolo de treinamento.

O primeiro TEMP foi realizado antes de iniciar o protocolo de treinamento para a determinação da velocidade inicial de treinamento. Nas 4ª e 7ª semanas de treinamento o TEMP foi realizado novamente para ajuste da velocidade de corrida, garantindo a aplicação adequada do princípio da sobrecarga ao treinamento. Ao final do protocolo de treinamento foi realizado o último TEMP.

Os ratos iniciaram o TEMP numa velocidade inicial de $6 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, sendo a velocidade progressivamente aumentada em $3 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ a cada intervalo de 3 minutos, até o animal alcançar a fadiga (Zanchi *et al.*, 2006). A fadiga foi determinada no momento em que os animais eram incapazes de manter o ritmo de passada na esteira rolante e, conseqüentemente, permaneceram por mais de 10 segundos na grade de choque (Soares *et al.*, 2003;2004; Soares *et al.*, 2007).

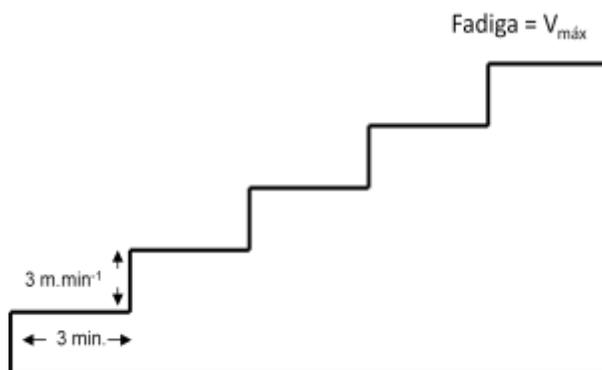


Figura 3: Protocolo de teste de esforço máximo progressivo

O tempo de exercício e a velocidade máxima de corrida nos TEMPs foram usados para confirmar a eficácia do protocolo de treinamento dos animais. A distância percorrida e o trabalho foram calculados conforme descrição abaixo.

Distância (m) = Σ [velocidade (m.min⁻¹) x tempo (min)] (valor calculado para cada intervalo de tempo)

Trabalho (Kgm) = m.TTE.v.sen α (valor calculado para cada intervalo de tempo)

m=massa (g)

TTE = Tempo total de exercício até a fadiga (min)

v = velocidade (m.min⁻¹)

sen α = inclinação da esteira

3.6. Protocolo de treinamento físico

Os animais do grupo treinado foram submetidos ao protocolo de exercício aeróbio durante 8 semanas com sessões diárias de 45 a 60 min.dia⁻¹, sendo a frequência de 5 dias por semana. As sessões de treinamento foram realizadas entre 7h e 12h no período da manhã.

O parâmetro utilizado para determinar a intensidade do esforço dos animais foi a velocidade máxima alcançada pelos ratos no TEMP (Jackson *et al.*, 2005), já que, em um estudo realizado anteriormente, foi verificada uma correlação direta entre o pico máximo de consumo de oxigênio e a velocidade máxima de corrida atingida em teste de esforço máximo (Evangelista *et al.*, 2005).

O treinamento foi de intensidade progressiva, levando em consideração o princípio da individualidade dos animais (Tabela 1). As duas primeiras semanas do protocolo de treinamento consistiram de períodos de adaptação, nas quais

ocorreram aumentos graduais da velocidade de corrida e duração das sessões de exercício até o alcance da intensidade desejada (70-75% V_{max} , alcançada no TEMP) e do tempo de corrida de 45-60 minutos (Priviero *et al.*, 2004). A partir da terceira semana até o término do protocolo de treinamento os animais foram submetidos à corrida na esteira rolante a 70-75% da $V_{máx}$ e foram realizados os TEMPs para ajustes das velocidades de corrida.

No início do protocolo experimental, um dos animais selecionados aleatoriamente para o grupo treinado mostrou-se incapaz de manter a cadência de passada na esteira rolante durante os protocolos de adaptação e de TEMP, e esse animal foi excluído do experimento. Além disso, ao longo do protocolo de treinamento, dois animais do grupo treinado foram encontrados mortos na gaiola coletiva. No término do experimento o grupo treinado apresentou um número amostral de 7 animais.

Tabela 1 – Programa de treinamento físico.

TREINAMENTO PROGRESSIVO (INTENSIDADE ALTA)	
1º TEMP	Determinação da velocidade máxima de corrida ($V_{máx}$) e do tempo total de exercício.
1ª semana Adaptação	Intensidade: 28% $V_{máx}$ Duração: 1º dia: 30 minutos. 2º dia: 45 minutos. 3º dia: 50 minutos. 4º dia: 55 minutos. 5º dia: 60 minutos.
2ª semana Adaptação	Intensidade: 44% $V_{máx}$ Duração: 60 minutos.
3ª a 4ª semana	Intensidade: 70% $V_{máx}$ Duração: 60 minutos.
2º TEMP	Determinação da velocidade máxima de corrida ($V_{máx}$) e do tempo total de exercício.
5ª a 7ª semana	Intensidade: 75% $V_{máx}$ (ajuste da velocidade em relação ao 2º TEMP) Duração: 60 minutos.
3º TEMP	Determinação da velocidade máxima de corrida ($V_{máx}$) e do tempo total de exercício.
8ª a 10ª semana	Intensidade: 75% $V_{máx}$ (ajuste da velocidade em relação ao 3º TEMP). Duração: 45 minutos.
4º TEMP	Determinação da velocidade máxima de corrida ($V_{máx}$) e do tempo total de exercício.
Eutanásia	Eutanásia dos animais em repouso (72h após o último TEMP).

3.7. Protocolo de exercício físico constante

Para assegurar a mesma manipulação dos ratos do grupo treinado, os animais do grupo controle foram submetidos à caminhada na esteira rolante durante 5 dias consecutivos por 5 minutos, em uma velocidade de 5 m.min⁻¹ ao longo do mesmo período de treinamento físico.

3.8. Eutanásia

Ao término do protocolo experimental, 72 h após a última sessão de teste de esforço máximo progressivo, os animais, em estado alimentado, foram eutanasiados por decapitação entre 7h e 12h e, o tecido muscular esquelético (gastrocnêmico e sóleo) e os tecidos adiposos (epididimal, retroperitoneal e mesentérico) foram dissecados e, imediatamente, pesados e resfriados em nitrogênio líquido. Em seguida, foram armazenados em freezer a -80°C para posteriores análises.

Os tecidos adiposos epididimal (TAE), retroperitoneal (TAR) e mesentérico (TAM) foram utilizados para o cálculo do índice de adiposidade intraperitoneal (%) (Kumar *et al.*, 1999). O índice de adiposidade foi calculado pela fórmula abaixo.

$$\text{Índice de adiposidade (\%)} = \frac{(\text{TAE} + \text{TAR} + \text{TAM})}{\text{Massa corporal}} \times 100$$

O sangue coletado foi centrifugado para obtenção de soro, que foi então armazenado em freezer -20°C para análises bioquímicas posteriores.

3.9. Dosagens das concentrações séricas

As concentrações séricas de glicose, triacilgliceróis e colesterol total foram determinados por kit enzimático (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados foram medidas utilizando o kit NEFA 30T (Randox Laboratories, Antrim, Reino Unido). A concentração sérica de insulina foi avaliada pelo método de ELISA (Millipore, Darmstadt, Alemanha). A quantificação da concentração de corticosterona sérica foi realizada através da técnica de imunensaio, utilizado-se kit específico (Enzo Life Sciences, Science Pro, São Caetano do Sul, SP, Brasil).

3.10. Determinação da concentração intramuscular de triacilglicerol (IMTG)

O músculo gastrocnêmico foi homogeneizado em solução triton X-100. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para determinação de triacilglicerol intramuscular através do método espectrofotométrico (Figueira *et al.*, 2007).

3.11. Determinação do glicogênio muscular

O glicogênio muscular foi extraído do músculo gastrocnêmico e a concentração determinada pelo método da antrona conforme recomendado em estudo prévio (Hassid & Abraham, 1957).

3.12. Determinação da atividade da enzima citrato sintase

As amostras de tecido muscular (sóleo) foram homogeneizadas em solução de extração [Tris-HCL (50 mM), EDTA (1 mM), pH 7,4]. A reação foi preparada com mistura de ensaio [tampão de extração, triton 1%, acetil-CoA, KHCO₃ (1M) e anidrido acético] e substrato (ácido oxaloacético). A leitura cinética foi feita em espectrofotômetro (412 nm; 25°C) durante 10 minutos (Alp *et al.*, 1976).

3.13. Extração de citocinas dos tecidos

Fragmentos de tecidos (100 mg) adiposos (epididimal e retroperitoneal) e muscular (gastrocnêmico) foram homogeneizados em 1 mL de solução de extração de citocinas, preparada a partir de solução de tampão fosfato (NaCl 8 g, KCl 0,2 g e Na₂HPO₄.12H₂O 2,89 g diluídos em 1 litro), contendo inibidores de proteases (NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina). Em seguida, a solução resultante foi centrifugada por 10 minutos a 4°C e o infranadante foi retirado e armazenado em freezer a -80°C para posterior análise pelo método de ELISA (R & D Systems).

3.14. Determinação de citocinas dos tecidos adiposos e muscular

As amostras obtidas na extração de citocinas dos tecidos adiposos e muscular foram diluídas em PBS contendo 0,1% de albumina bovina. As concentrações de TNF- α e IL-6 foram determinadas utilizando anticorpos obtidos da R&D systems (DuoSet), seguindo as instruções do fabricante para a realização dos ensaios.

3.15. Quantificação das proteínas das amostras

Fragmentos de tecidos (100 mg) adiposo (epididimal) e muscular (gastrocnêmico) foram homogeneizados em tampão de lise contendo inibidores de proteases e fosfatase e, posteriormente foram centrifugados (2.500 rpm, 20 min, 4°C) para remoção da fase intermediária. As proteínas foram quantificadas através do método de Bradford (Bradford, 1976).

3.16. Western blotting

As amostras, contendo 50 µg para tecido muscular e 30 µg para tecido adiposo, foram aquecidas a 95°C por 5 min antes de serem aplicadas em gel de poliacrilamida (7,5%). Na lateral do gel foi aplicado um padrão de peso molecular (20-200 kDa, Invitrogen). As proteínas foram transferidas para as membranas de PVDF que foram bloqueadas para ligações não específicas com tampão de tris salina com detergente tween 20, TBS-T (Tris base e cloreto de sódio, pH 7,6 e 1% Tween 20) contendo leite desnatado (em diferentes concentrações: 1, 3 e 5%) por 1 h. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo primário no período da noite em temperatura ambiente de 4°C. As membranas foram lavadas com tampão TBS-T e foi feita a incubação com anticorpo secundário (anti-rabbit; anti-goat; anti-mouse) por 1 h. Finalizada a incubação as membranas foram novamente lavadas com tampão TBS-T e expostas ao agente quimioluminescente (Millipore) e, então as proteínas foram reveladas em filme fotográfico. As proteínas analisadas foram: proteína de transporte de ácido graxo (CD36), lipase de triacilgliceróis (ATGL), lipase hormônio sensível (HSL), acetil-CoA carboxilase (ACC), transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4), perilipinas, proteína adenosina monofosfato quinase (AMPKp).

Proteína	Fabricante	Espécie	Diluição	Peso Molecular	Anticorpo Secundário
CD36	Abcam	Rabbit	1:500	82-85 kDa	Anti rabbit 1:2000
ATGL	Abcam	Rabbit	1:1000/1:500	55 kDa	Anti rabbit 1:2000
HSL	Santa Cruz	Rabbit	1:500	90 kDa	Anti rabbit 1:2000
ACC	Santa Cruz	Rabbit	1:100	265 kDa	Anti rabbit 1:2000
GLUT4	Chemicon	Rabbit	1:500	40-43 kDa	Anti rabbit 1:2000
Perilipinas	Santa Cruz	Goat	1:500	57 kDa	Anti goat 1:2000
AMPKp	Abcam	Rabbit	1:1000	62 kDa	Anti rabbit 1:2000
GAPDH	Santa Cruz	Mouse	1:2000	36 kDa	Anti mouse 1:2000

Tabela 2 - Especificações das proteínas

3.17. PCR real time

O RNA total dos tecidos adiposo (epididimal) e muscular (gastrocnêmico) foi extraído (100 mg de tecido) usando reagente Tris-Phasis (BioAgency). Depois da quantificação, as amostras foram tratadas com DNase e foi feita a transcrição reversa usando a enzima M-MuL-V (Fermentas). O cDNA (1000 ng) foi amplificado usando primers específicos de: receptor da ativação da proliferação peroxissomal α (PPAR α) (forward: 5'-taccactatggagtccacgcatgt-3'; reverse: 5'-

ttgcagcttcgatcacacttgctcg); carnitina palmitoil transferase (CPT-1) (forward: 5'-acgtgagtgactgggggaagaat-3'; reverse: 5'-tctccatggcgtagtagtgctgt-3'); proteína ligadora do elemento responsivo ao esteroide 1c (SREBP-1c) (forward: 5'-cgccacaatgccattgaga-3'; reverse: 5'-gcagattattcagcttgcttca-3'); receptor da ativação da proliferação peroxissomal γ (PPAR γ) (forward: 5'-agatcatctacacatgctggcct-3'; reverse: 5'-aggaactccctggatcatgaatcct-3'); acil CoA oxidase (ACO) (forward: 5'-atctctgtggtgctgtggagtca-3', reverse: 5'-tctggatgcttccttccaaggt-3'); acil CoA sintase (ACS) (forward: 5'-ggccaaacagaatgcacag-3', reverse: 5'-ggagtccaacatgacctg-3'); tribbles 3 (TRB3) (forward: 5'-tgcgtcgctttgtcttcagcaact-3', reverse: 5'-atccagtcacacgcaggcatctt-3'); S-26 (forward: 5'-cgattcctgacaaccttgcta-3'; reverse: 5'-cgtgcttccaagctctatgt-3') e tampão PCR SYBR[®] Green, em um aparelho (ABI Prism 7000 platform; Applied Biosystems). S26 foi co-amplificado como normalizador endógeno dos genes. As sequências específicas dos primers foram determinadas pelas sequências disponíveis no geneBank (BLAST, NCBI). A média dos valores CT do normalizador endógeno foi subtraída das amostras derivando o Δ CT. Para analisar as expressões dos genes de interesse, por método semi-quantitativo, foi utilizado a análise de $2^{-(\Delta - \Delta CT)}$ (Pfaffl, 2001).

3.18. Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados experimentais foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e as diferenças entre os grupos foram analisadas pelo método estatístico paramétrico de teste-T de *Student*. Foi utilizada a Anova two way seguida de post-hoc Newman Keuls para determinação de diferenças ao longo do tempo entre os grupos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Sigma Stat 3.5 e os gráficos foram elaborados no programa Sigma Plot 11.0. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS:

NÃO PUBLICADOS

5. DISCUSSÃO:

NÃO PUBLICADO

6. CONCLUSÃO:

NÃO PUBLICADO

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alp, P. R., E. A. Newsholme, et al. (1976). "Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates." Biochem J **154**(3): 689-700.
- Beylot, M., S. Neggazi, et al. (2012). "Perilipin 1 ablation in mice enhances lipid oxidation during exercise and does not impair exercise performance." Metabolism **61**(3): 415-423.
- Bi, X. P., H. W. Tan, et al. (2008). "Overexpression of TRB3 gene in adipose tissue of rats with high fructose-induced metabolic syndrome." Endocr J **55**(4): 747-752.
- Bogacka, I., H. Xie, et al. (2004). "The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage in vivo." Diabetes Care **27**(7): 1660-1667.
- Bonen, A., S. E. Campbell, et al. (2004). "Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36." Proc Nutr Soc **63**(2): 245-249.
- Bonen, A., X. X. Han, et al. (2007). "A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(6): E1740-1749.
- Bonen, A., J. J. Luiken, et al. (2000). "Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase." J Biol Chem **275**(19): 14501-14508.
- Botton, L. M., A. R. Brasier, et al. (2001). "Inhibition of proteasome activity blocks the ability of TNF alpha to down-regulate G(i) proteins and stimulate lipolysis." Endocrinology **142**(12): 5069-5075.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bruunsgaard, H., H. Galbo, et al. (1997). "Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage." J Physiol **499 (Pt 3)**: 833-841.
- Calvani, M., G. Peluso, et al. (2003). "The Role of Carnitine System in Maintaining Muscle Homeostasis." Basic Appl Myol **13** (3): 105-120.
- Campbell, S. E., N. N. Tandon, et al. (2004). "A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria." J Biol Chem **279**(35): 36235-36241.
- Cawthorn, W. P. and J. K. Sethi (2008). "TNF-alpha and adipocyte biology." FEBS Lett **582**(1): 117-131.
- Chapados, N., P. Collin, et al. (2008). "Exercise training decreases in vitro stimulated lipolysis in a visceral (mesenteric) but not in the retroperitoneal fat depot of high-fat-fed rats." Br J Nutr **100**(3): 518-525.
- Drenth, J. P., S. H. Van Uum, et al. (1995). "Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production." J Appl Physiol **79**(5): 1497-1503.

- Du, K., S. Herzig, et al. (2003). "TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver." Science **300**(5625): 1574-1577.
- Espersen, G. T., A. Elbaek, et al. (1990). "Effect of physical exercise on cytokines and lymphocyte subpopulations in human peripheral blood." APMIS **98**(5): 395-400.
- Etgen, G. J., Jr., J. Jensen, et al. (1997). "Exercise training reverses insulin resistance in muscle by enhanced recruitment of GLUT-4 to the cell surface." Am J Physiol **272**(5 Pt 1): E864-869.
- Evangelista, F. S., S. E. Martuchi, et al. (2005). "Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes." Braz J Med Biol Res **38**(7): 1141-1146.
- Evans, R. M., G. D. Barish, et al. (2004). "PPARs and the complex journey to obesity." Nat Med **10**(4): 355-361.
- Fernandez, C., O. Hansson, et al. (2008). "Hormone-sensitive lipase is necessary for normal mobilization of lipids during submaximal exercise." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(1): E179-186.
- Ferreira, A. V., G. G. Parreira, et al. (2008). "Fenofibrate prevents orotic acid--induced hepatic steatosis in rats." Life Sci **82**(15-16): 876-883.
- Figueira, T. R., M. C. S. Lima, et al. (2007). "Efeito do treinamento aeróbio sobre o conteúdo muscular de triglicérides e glicogênio em ratos." R. bras. Ci e Mov. **15**(2): 55-61.
- Forouhi, N. G., G. Jenkinson, et al. (1999). "Relation of triglyceride stores in skeletal muscle cells to central obesity and insulin sensitivity in European and South Asian men." Diabetologia **42**(8): 932-935.
- Francischi, R. P., L. O. Pereira, et al. (2001). "Exercício, comportamento alimentar e obesidade: Revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos." Rev. paul. Educ. Fís. **15**(2).
- Friedman, J. E., W. M. Sherman, et al. (1990). "Exercise training increases glucose transporter protein GLUT-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats." FEBS Lett **268**(1): 13-16.
- Gollisch, K. S., J. Brandauer, et al. (2009). "Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(2): E495-504.
- Gomez-Merino, D., C. Drogou, et al. (2007). "Effects of chronic exercise on cytokine production in white adipose tissue and skeletal muscle of rats." Cytokine **40**(1): 23-29.
- Goodpaster, B. H., J. He, et al. (2001). "Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes." J Clin Endocrinol Metab **86**(12): 5755-5761.
- Goodpaster, B. H., R. Theriault, et al. (2000). "Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss." Metabolism **49**(4): 467-472.
- Hamilton, M. T. and F. W. Booth (2000). "Skeletal muscle adaptation to exercise: a century of progress." J Appl Physiol **88**(1): 327-331.
- Hammarstedt, A., C. X. Andersson, et al. (2005). "The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **73**(1): 65-75.

- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 774-785.
- Hardie, D. G. and K. Sakamoto (2006). "AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle." Physiology (Bethesda) **21**: 48-60.
- Hassid, W. Z. and S. Abraham (1957). "Chemical procedures for analysis of polysaccharides." Methods Enzymol. **3**: 35-36.
- Henriksen, E. J. (2002). "Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance." J Appl Physiol **93**(2): 788-796.
- Holloszy, J. O. (2008). "Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4." J Physiol Pharmacol **59 Suppl 7**: 5-18.
- Horowitz, J. F. (2003). "Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise." Trends Endocrinol Metab **14**(8): 386-392.
- Huijsman, E., C. van de Par, et al. (2009). "Adipose triacylglycerol lipase deletion alters whole body energy metabolism and impairs exercise performance in mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(2): E505-513.
- Ibrahimi, A., A. Bonen, et al. (1999). "Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin." J Biol Chem **274**(38): 26761-26766.
- Ikeda, S., H. Miyazaki, et al. (2002). "Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training." Biochem Biophys Res Commun **296**(2): 395-400.
- Jackson, K., H. M. Silva, et al. (2005). "Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus." J Neurophysiol **94**(5): 3211-3220.
- Jeon, J. Y. and Y. B. Kim (2012). "Is perilipin critical in fat utilization during exercise?" Metabolism **61**(3): 291-292.
- Kawakami, M., T. Murase, et al. (1987). "Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells." J Biochem **101**(2): 331-338.
- Kelley, D. E., B. Goodpaster, et al. (1999). "Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss." Am J Physiol **277**(6 Pt 1): E1130-1141.
- Kelly, M., C. Keller, et al. (2004). "AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise." Biochem Biophys Res Commun **320**(2): 449-454.
- Kersten, S. (2001). "Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis." EMBO Rep **2**(4): 282-286.
- Kersten, S., B. Desvergne, et al. (2000). "Roles of PPARs in health and disease." Nature **405**(6785): 421-424.
- Kiens, B., C. Roepstorff, et al. (2004). "Lipid-binding proteins and lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle: influence of physical activity and gender." J Appl Physiol **97**(4): 1209-1218.
- Kim, J. Y., R. C. Hickner, et al. (2000). "Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(5): E1039-1044.
- Kraemer, F. B. and W. J. Shen (2006). "Hormone-sensitive lipase knockouts." Nutr Metab (Lond) **3**: 12.

- Kraniou, G. N., D. Cameron-Smith, et al. (2004). "Effect of short-term training on GLUT-4 mRNA and protein expression in human skeletal muscle." Exp Physiol **89**(5): 559-563.
- Kumar, M. V., G. D. Sunvold, et al. (1999). "Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA." J Lipid Res **40**(5): 824-829.
- Lafontan, M. (2008). "Advances in adipose tissue metabolism." Int J Obes (Lond) **32 Suppl 7**: S39-51.
- Lafontan, M. and D. Langin (2009). "Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue." Prog Lipid Res **48**(5): 275-297.
- Langin, D. and P. Arner (2006). "Importance of TNFalpha and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis." Trends Endocrinol Metab **17**(8): 314-320.
- Lass, A., R. Zimmermann, et al. (2011). "Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores." Prog Lipid Res **50**(1): 14-27.
- Lima, A. F., E. R. Ropelle, et al. (2009). "Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice." J Cell Physiol **221**(1): 92-97.
- Luiken, J. J., S. L. Coort, et al. (2003). "Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling." Diabetes **52**(7): 1627-1634.
- Luiken, J. J., D. J. Dyck, et al. (2002). "Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(2): E491-495.
- Lyngso, D., L. Simonsen, et al. (2002). "Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: the effect of exercise." J Physiol **543**(Pt 1): 373-378.
- Mandard, S. and S. Kersten (2006). "Regulation of lipogenic genes in obesity." Nutritional Genomics : Impact on Health and Disease: 208-219.
- Mandard, S., M. Muller, et al. (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes." Cell Mol Life Sci **61**(4): 393-416.
- Marinho, R., E. R. Ropelle, et al. (2012). "Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss." J Cell Physiol **227**(7): 2917-2926.
- Mathis, D. and S. E. Shoelson (2011). "Immunometabolism: an emerging frontier." Nat Rev Immunol **11**(2): 81.
- Matos, A., E. R. Ropelle, et al. (2010). "Acute exercise reverses TRB3 expression in the skeletal muscle and ameliorates whole body insulin sensitivity in diabetic mice." Acta Physiol (Oxf) **198**(1): 61-69.
- Matsumoto, M., S. Han, et al. (2006). "Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism." J Clin Invest **116**(9): 2464-2472.
- Mu, J., J. T. Brozinick, Jr., et al. (2001). "A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle." Mol Cell **7**(5): 1085-1094.

- Neels, J. G. and J. M. Olefsky (2006). "Cell signaling. A new way to burn fat." Science **312**(5781): 1756-1758.
- Neto, J. C. R., F. S. Lira, et al. (2009). "Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats." European Journal of Applied Physiology **106**(5): 697-704.
- Nickerson, J. G., H. Alkhateeb, et al. (2009). "Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle." J Biol Chem **284**(24): 16522-16530.
- Ohoka, N., S. Yoshii, et al. (2005). "TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death." EMBO J **24**(6): 1243-1255.
- Park, H., V. K. Kaushik, et al. (2002). "Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise." J Biol Chem **277**(36): 32571-32577.
- Pedersen, B. K. and M. A. Febbraio (2012). "Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ." Nat Rev Endocrinol **8**(8): 457-465.
- Pedersen, B. K. and L. Hoffman-Goetz (2000). "Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation." Physiol Rev **80**(3): 1055-1081.
- Petridou, A., S. Tsalouhidou, et al. (2007). "Long-term exercise increases the DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in rat adipose tissue." Metabolism **56**(8): 1029-1036.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Priviero, F., G. De Nucci, et al. (2004). "Negative chronotropic response to adenosine receptor stimulation in rat right atria after run training." Clin Exp Pharmacol Physiol **31**(10): 741-743.
- Richter, E. A. and N. B. Ruderman (2009). "AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease." Biochem J **418**(2): 261-275.
- Sato, R. (2009). "SREBPs: protein interaction and SREBPs." FEBS J **276**(3): 622-627.
- Schoiswohl, G., M. Schweiger, et al. (2010). "Adipose triglyceride lipase plays a key role in the supply of the working muscle with fatty acids." J Lipid Res **51**(3): 490-499.
- Soares, D. D., C. C. Coimbra, et al. (2007). "Tryptophan-induced central fatigue in exercising rats is related to serotonin content in preoptic area." Neurosci Lett **415**(3): 274-278.
- Soares, D. D., N. R. Lima, et al. (2003). "Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats." Pharmacol Biochem Behav **74**(2): 357-362.
- Soares, D. D., N. R. Lima, et al. (2004). "Intracerebroventricular tryptophan increases heating and heat storage rate in exercising rats." Pharmacol Biochem Behav **78**(2): 255-261.

- Sonne, B. and H. Galbo (1980). "Simultaneous determinations of metabolic and hormonal responses, heart rate, temperature and oxygen uptake in running rats." Acta Physiol Scand **109**(2): 201-209.
- Stallknecht, B., J. Vinten, et al. (1991). "Increased activities of mitochondrial enzymes in white adipose tissue in trained rats." Am J Physiol **261**(3 Pt 1): E410-414.
- Starkie, R. L., J. Rolland, et al. (2001). "Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running." Am J Physiol Cell Physiol **280**(4): C769-774.
- Steensberg, A., C. Keller, et al. (2002). "IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(6): E1272-1278.
- Su, X. and N. A. Abumrad (2009). "Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction." Trends Endocrinol Metab **20**(2): 72-77.
- Sutherland, L. N., M. R. Bomhof, et al. (2009). "Exercise and adrenaline increase PGC-1{alpha} mRNA expression in rat adipose tissue." J Physiol **587**(Pt 7): 1607-1617.
- Tansey, J. T., C. Sztalryd, et al. (2001). "Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6494-6499.
- Taubes, G. (2009). "Insulin resistance. Prosperity's plague." Science **325**(5938): 256-260.
- Terada, S., M. Goto, et al. (2002). "Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle." Biochem Biophys Res Commun **296**(2): 350-354.
- Thompson, D., F. Karpe, et al. (2012). "Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology." Physiol Rev **92**(1): 157-191.
- Torti, F. M., B. Dieckmann, et al. (1985). "A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia." Science **229**(4716): 867-869.
- Trayhurn, P. and J. H. Beattie (2001). "Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ." Proc Nutr Soc **60**(3): 329-339.
- Tunstall, R. J., K. A. Mehan, et al. (2002). "Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(1): E66-72.
- van Hall, G., A. Steensberg, et al. (2003). "Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans." J Clin Endocrinol Metab **88**(7): 3005-3010.
- Vieira, V. J. and R. J. Valentine (2009). "Mitochondrial biogenesis in adipose tissue: can exercise make fat cells 'fit'?" J Physiol **587**(Pt 14): 3427-3428.
- Wallenius, V., K. Wallenius, et al. (2002). "Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity." Nat Med **8**(1): 75-79.
- Watt, M. J. (2009). "Triglyceride lipases alter fuel metabolism and mitochondrial gene expression." Appl Physiol Nutr Metab **34**(3): 340-347.
- Yen, C. L. and R. V. Farese, Jr. (2006). "Fat breakdown: a function for CGI-58 (ABHD5) provides a new piece of the puzzle." Cell Metab **3**(5): 305-307.

- Zanchi, N. E., L. R. G. Bechara, et al. (2006). "Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a bioatividade do óxido nítrico e a vasodilatação aórtica." Rev Bras Educ Fís Esp **20**(4): 239-247.
- Zang, Y., T. Wang, et al. (2005). "Regulation of acetyl CoA carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 in rat adipocytes." Obes Res **13**(9): 1530-1539.
- Zechner, R., R. Zimmermann, et al. (2012). "FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling." Cell Metab **15**(3): 279-291.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.
- Zimmermann, R., J. G. Strauss, et al. (2004). "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase." Science **306**(5700): 1383-1386.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 29/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Regulação da CD36 e enzimas lipolíticas em ratos submetidos ao treinamento**", que tem como responsável(is) **Leida Maria Botion**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **15/ 04/2009**.

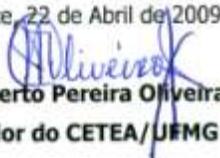
Este certificado expira-se em **15/ 04/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 29/2009**, related to the project entitled "**CD36 regulation and lipolytic enzymes in rats submitted to training**", under the supervisors of **Leida Maria Botion**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 15, 2009**.

This certificate expires in **April 15, 2014**.

Belo Horizonte, 22 de Abril de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)