

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STEFANI VALÉRIA FISCHER

METABOLISMO DA GLICOSE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO  
ADIPOSO VISCERAL DE ANIMAIS OBESOS-INDUZIDOS POR REDUÇÃO DE  
NINHADA SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO CRÔNICO PRECOCE DE NATAÇÃO.

CURITIBA

2018

STEFANI VALERIA FISCHER

METABOLISMO DA GLICOSE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO  
ADIPOSO VISCERAL DE ANIMAIS OBESOS-INDUZIDOS POR REDUÇÃO DE  
NINHADA SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO CRÔNICO PRECOCE DE NATAÇÃO.

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia, do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes  
Co-Orientador (a): Prof. Dra. Márcia Helena Appel

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Fischer, Stefani Valeria

Metabolismo da glicose no músculo esquelético e tecido adiposo visceral de animais obesos-induzidos por redução de ninhada submetidos ao exercício crônico precoce de natação. / Stefani Valeria Fischer. – Curitiba, 2018.  
65 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Luiz Cláudio Fernandes

Co-orientadora: Márcia Helena Appel

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Obesidade. 2. Tecido adiposo. 3. Lipídios. I. Título II. Fernandes, Luiz Cláudio. III. Appel, Márcia Helena. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 616.398

## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **STEFANI VALÉRIA FISCHER** para fins de obter o título de Doutora em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer à APROVAÇÃO (aprovação/reprovação) da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação, bem como do item III do artigo 80 da resolução 65/09 do CEPE-UFPR.

Curitiba, 07 de março de 2018.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
<u>APROVADA</u>	<b>Profa. Dra. Carla Cristine Kanufre</b> UEPG - Membro Titular	
<u>APROVADA</u>	<b>Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte</b> UEM - Membro Titular	
<u>APROVADA</u>	<b>Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki</b> UFPR - Membro Titular	
<u>APROVADA</u>	<b>Profa. Dra. Fabíola Iagher</b> UFPR - Membro Titular	
<u>APROVADA</u>	<b>Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes</b> UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora	

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Luiz Cláudio Fernandes, que depositou confiança em meu trabalho e sempre me direcionou com toda sua presteza e dedicação. Levo comigo professor seus ensinamentos, sua serenidade e o desafio da busca por novos conhecimentos. Agradeço por cada conversa e pelo cuidado que o professor tem em nos ensinar tudo que sabe.

À minha co-orientadora Márcia H. Appel, pela atenção e cuidado impar nestes 4 anos. Professora, devo a você grande parte do meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por escutar meus desabafos, me dar suporte nas adversidades, pelas palavras de incentivo e pelos conselhos (que sempre levarei comigo). Obrigada por construir comigo este trabalho!

À minha família, Valério, Agnes, Rafaela e Guilherme, a pura mistura de amor e orgulho! Obrigada pela força e pela torcida! Cada conquista minha é também de vocês!

Às alegrias dos meus dias, Juliana, Amanda, Andrielli, Diego, Sthephanie, Bruna, Débora e Carol. Cada um contribuiu para que meus dias fossem mais leves nessa caminha difícil e incerta que é a pós-graduação. Vou relembrar sempre os momentos vividos com vocês. Dentre eles alguns poucos: as intermináveis viagens para as aulas de tópicos, a falta de luz no meio dos experimentos, os auxílios em experimentos de 10 minutos que levaram um pouco mais (3 horas), os WB que nunca pareciam ter fim, os eternos Bradfords regados a muitas lágrimas, as secreções de insulina (uma semana sem praticamente dormir), aos docinhos “roubados” dos eventos pra alegrar meus dias, os mais deliciosos momentos de café e fofoca, os almoços na churrascaria pós-bolsa! Em especial a essa maluquinha, Dagiane, que sempre esteve comigo me dando todo apoio, sem se importar se eram fins de semana ou se iríamos iniciar as atividades diárias às 7 horas para terminar nossas atividades às 23 horas, obrigada!

A meus escudeiros da natação, Camila e Jhonny, o auxilio de vocês foi essencial.

Às ICs do coração, Raissa, Mis, Bruna e Ferdi, vocês foram excepcionais e demonstraram em cada experimento o quanto são profissionais. Torço pelo sucesso de vocês.

A você amor, Robson, por tudo! Por ser meu porto seguro, por se fazer presente nestes 4 anos mesmo a quase 400 Km de distância! Como eu já disse e torno a dizer: é pra você e por você que cheguei até aqui!

Às professoras do Fabíola e Kátia pelo apoio!

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da UFPR e aos professores.

A CAPES pela bolsa concedida.

## RESUMO

Lactação é considerada um período crítico do desenvolvimento para o organismo sendo uma das janelas de programação metabólica. Intervenções hormonais ou nutricionais nesta fase podem pré-dispor o organismo a doenças na idade adulta, em especial a obesidade. Associado à obesidade estão diversas comorbidades, das quais se destacam a resistência à insulina e alterações no metabolismo da glicose. O exercício físico atua como fator preventivo e de tratamento, capaz de promover alterações teciduais que levam a perda de peso e melhora da responsividade à insulina. O presente trabalho investigou o metabolismo da glicose no tecido muscular esquelético (ME) e adiposo visceral em ratos obesos-induzidos por redução de ninhada e os efeitos do exercício físico crônico precoce nestes animais. Ninhadas de ratos Wistar foram padronizadas em 10 filhotes por ninhada até o 3º dia de vida, posteriormente foram reajustadas em Grupo Controle (C), 10 filhotes e Grupo Obeso-induzido (OB), 3 filhotes por ninhada. Aos 21 dias houve o desmame e a subdivisão em 4 grupos: controle sedentário (CS), controle exercitados (CE), obeso-induzido sedentário (OBS) e obeso-induzido exercitado (OBE). O protocolo de exercício físico consistiu em natação 3x/semana/30min. Avaliou-se ganho de massa corporal (lactação e 22-90 dias) e consumo alimentar (22-90 dias). Aos 85 dias foi realizado teste de tolerância à insulina (ITT). Após ortotanásia, 90 dias, amostras de tecido foram dissecadas, pesadas e armazenadas. Parâmetros plasmáticos de glicemia, colesterolemia e triacilglicerolemia foram mensurados. Músculo sóleo e tecido adiposo perigonadal foram submetidos à incubação na presença ou ausência de insulina (10mU/ml) com adição de glicose (5,6 mM), 0,1 uCi / ml de D-[U-<sup>14</sup>C] glicose e 0,1 uCi / ml de 2-desoxi-D-[<sup>3</sup>H] glicose, para avaliação da produção de lactato total e radiomarcado. A expressão protéica do GLUT4(sóleo e tecido adiposo) e do PPARy(depósito viscerais de gordura) foram determinados. O % de ácido graxo (AG) do plasma, fígado e gorduras perigonadal, retroperitoneal e mesentérica foi identificado e quantificado por HPLC. O conteúdo de glicogênio muscular e dos depósitos de gordura foi mensurado. Os dados foram expressos como média ± SEM, submetidos à análise de variância ANOVA de duas vias, tendo como fatores a obesidade e exercício, (pós teste Bonferroni entre pares selecionados) e Teste t de Student's ( $p<0,05$ ). Houve aumento da massa corporal na lactação e na vida adulta, acompanhado do aumento dos depósitos viscerais e resistência à insulina nos obesos-induzidos. Não houve alteração nos padrões bioquímicos plasmáticos. O músculo sóleo apresentou-se responsável ao estímulo insulínico, comparada à menor responsividade da gordura visceral aos 90 dias. A natação conveve o aumento dos depósitos viscerais, promoveu aumento da gordura marrom e maior sensibilidade à insulina em ambos os grupos exercitados. Houve aumento na expressão do GLUT4 no ME nos animais CE e na gordura visceral de ambos os grupos exercitados. Houve alteração no % de AG tecidual em função da obesidade e do exercício. Desta forma, o maior aporte calórico promovido pela redução de ninhada no período lactacional favoreceu a instalação da obesidade, induziu resistência à insulina e alterações no % AG, estando a musculatura ainda responsável à insulina aos 90 dias apresentando alterações metabólicas no TA visceral. O exercício físico crônico precoce conveve a instalação da obesidade acompanhado da manutenção da responsividade à insulina na ME.

Palavras-chave: Obesidade. Programação metabólica. Músculo. Tecido adiposo. Lipídios.

## ABSTRACT

Lactation is considered a critical period of development for the body being one of the windows of metabolic programming. Hormonal or nutritional interventions at this stage may pre-dispose the body to diseases in adulthood, especially obesity. Associated with obesity are several comorbidities, such as insulin resistance and changes in glucose metabolism. Physical exercise acts as a preventive and treatment factor, capable of promoting tissue changes that lead to weight loss and improved insulin responsiveness. The present work investigated the metabolism of glucose in skeletal muscle tissue and visceral adipose in obese rats induced by litter reduction and the effects of early physical exercise in these animals. Wistar rats were standardized on 10 pups per litter until the third day of life, later they were readjusted in Control Group (C), 10 pups and Obese-induced Group (OB), 3 pups per litter. At 21 days, weaning and subdivision were performed in four groups: sedentary control (CS), exercised control (CE), obese-induced sedentary (OBS) and obese-induced exercise (OBE). The physical exercise protocol consisted of swimming 3x/week/30min. Body weight gain (lactation and 22-90 days) and food consumption (22-90 days) were evaluated. At the 85th day, an insulin tolerance test (ITT) was performed. After orthotanasia, 90 days, tissue samples were dissected, weighed and stored. Plasma parameters of glycemia, cholesterolemia and triacylglycerol were measured. The soleus muscle and perigonadal adipose tissue were incubated in the presence or absence of insulin (10mU/ml) with addition of glucose (5.6mM), 0,1 uCi/ml D-[U-<sup>14</sup>C] glucose and 0,1 uCi/ml of 2-deoxy-D-[<sup>3</sup>H] glucose, for evaluation of total and radiolabelled lactate production. The protein expression of GLUT4 (sole and adipose tissue) and PPAR $\gamma$  (visceral fat deposits) were determined. The percent of fatty acid (AG) in plasma, liver and perigonadal, retroperitoneal and mesenteric fats was identified and quantified by HPLC. The content of muscle glycogen and fat deposits was measured. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM, submitted to analysis of variance of two-way ANOVA, including obesity and exercise (Bonferroni test between selected pairs) and Student's t test ( $p < 0,05$ ). There was an increase in body mass in lactation and in adulthood, accompanied by increased visceral deposits and insulin resistance in obese-induced. There was no change in plasma biochemical patterns. The soleus muscle was responsive to the insulin stimulus, compared to the lower responsiveness of visceral fat at 90 days. Swimming contained an increase in visceral deposits, increased brown fat and increased insulin sensitivity in both groups. There was an increase in the expression of GLUT4 in ME in CE animals and visceral fat in both groups. There was alteration in the percentage of tissue AG as a function of obesity and exercise. Thus, the higher caloric intake promoted by litter reduction in the lactational period favored the establishment of obesity, induced insulin resistance and changes in % AG, and the musculature was still responsive to insulin at 90 days presenting metabolic alterations in visceral TA. The early chronic physical exercise contained the installation of obesity accompanied by the maintenance of insulin responsiveness in ME.

Key words: Obesity. Metabolic programming. Muscle. Adipose tissue. Lipids.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MUDANÇAS NO TECIDO ADIPOSO OBESO .....	18
FIGURA 2 - PISCINAS ADAPTADAS PARA NATAÇÃO.....	27
FIGURA 3 - LINHA TEMPORAL .....	29
FIGURA 4 - PROCESSO DE INCUBAÇÃO DOS TECIDOS .....	31
FIGURA 5 - MASSA CORPÓREA AOS 7, 14 E 21 DIAS E ÍNDICE DE LEE (IL) AOS 21 DIAS .....	34
FIGURA 6 - MASSA CORPORAL DOS 22 AOS 89 DIAS E ÁREA SOB A CURVA (AUC) .....	35
FIGURA 7 - INGESTÃO ALIMENTAR DOS ANIMAIS DOS 22 AOS 89 DIAS .....	36
FIGURA 8 - PESO DAS GORDURAS VISCERAIS E TECIDO ADIPOSO MARROM.	37
FIGURA 9 - TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA. ....	39
FIGURA 10 - PRODUÇÃO DE LACTATO TOTAL E RADIOMARCADO PELO MÚSCULO SÓLEO INCUBADO.....	40
FIGURA 11 - PRODUÇÃO DE LACTATO TOTAL E RADIOMARCADO PELAGORDURA PERIGONADAL .....	41
FIGURA 12 - CAPTAÇÃO DE 2 DESOXI [3H] GLICOSEPELO MÚSCULO SÓLEO ISOLADO. ....	42
FIGURA 13 - CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO NO MÚSCULO SÓLEO APÓS A DISSECAÇÃO E APÓS 1 HORA DE INCUBAÇÃO. ....	43
FIGUR 14 - CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO NO TECIDO ADIPOSO PERIGONADAL, MESENTÉRICO E RETROPERITONEAL APÓS A DISSECAÇÃO. ....	44
FIGURA 15- EXPRESSÃO DE GLUT4 NO MÚSCULO SÓLEO E TECIDO ADIPOSO .....	45
FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE PPAR $\gamma$ NO TECIDO ADIPOSO .....	46

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - PESO DE ÓRGÃOS AOS 90 DIAS.....	38
TABELA 2 - CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, COLESTEROL TOTAL E TRIACILGLICEROL NO PLASMA.....	38
TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS PLASMÁTICAS E DO FÍGADO AOS 90 DIAS.....	47
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%) NAS AMOSTRAS DE GORDURA MESENTÉRICA, RETROPERITONEAL E PERIGONADAL AOS 90 DIAS DE VIDA.....	49

## LISTA DE SIGLAS

AA	- Ácido Araquidônico
AKt2	- Quinase serina-treonina 2
AG	- Ácido graxo
AGPI	- Ácido graxo poliinsaturado
AUC	- Área sob a curva
C	- Controle
CE	- Controle exercitado
CS	- Controle sedentário
DHA	- Ácido Docosahexaenóico
DM2	- Diabetes mellitus tipo 2
EPA	- Ácido Eicosapentaenóico
GLUTs	- Transportadores de glicose
GLUT4	- Transportados de glicose 4
HPLC	- Cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography)
IL	- Índice de Lee
IL- 10	- Interleucina 10
IRS-1	- Substrato 1 para receptor de insulina
ITT	- Teste de tolerância à insulina
LC-FACS	- Ácido graxo de cadeia longa acil-CoA ligase (ou sintase)
ME	- Músculo esquelético
OB	- Obeso
OBS	- Obeso sedentário
OBE	- Obeso exercitado
MCP-1	- Proteína-1 quimioatratora de monócito
PPAR $\gamma$	- Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma

- RI - Resistência à Insulina
- TA - Tecido adiposo
- TAM - Tecido adiposo marrom
- TNF $\alpha$  - Fator alfa de necrose tumoral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1	OBESIDADE E ALTERAÇÕES NO METABOLISMO PERIFÉRICO .....	14
1.2	TECIDO ADIPOSO E FISIOPATOLOGIAS NA OBESIDADE .....	15
1.3	FISIOPATOLOGIAS DO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO NA OBESIDADE .....	18
1.4	PROGRAMAÇÃO METABÓLICA NA LACTAÇÃO.....	19
1.5	EXERCÍCIO FÍSICO .....	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1	GERAL.....	25
2.2	ESPECÍFICOS.....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1	ANIMAIS .....	26
3.2	INDUÇÃO DA OBESIDADE .....	26
3.3	PROTOCOLO DE TREINAMENTO.....	27
3.4	EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL .....	28
3.5	CONSUMO ALIMENTAR .....	28
3.6	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT).....	28
3.7	AVALIAÇÃO DA OBESIDADE.....	29
3.8	DOSAGENS BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS .....	29
3.9	INCUBAÇÃO MÚSCULO SÓLEO E GORDURA PERIGONADAL COM D-[U- <sup>14</sup> C] GLICOSE E DA 2-DESOXI- D- [ <sup>3</sup> H] GLICOSE.....	30
3.9.1	Produção de Lactato total e [U- <sup>14</sup> C] lactato.....	30
3.9.2	Captação de 2-Deoxy-D-[3H] glicose no músculo sóleo. ....	31
3.10	CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO.....	31
3.11	IDENTIFICAÇÃO E PERCENTUAL DE ÁCIDO GRAXO DETERMINADOS POR HPLC .....	32
3.12	WESTERN BLOTTING .....	32
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1	CARACTERÍSTICAS DAS NINHADAS NO PERÍODO DA LACTAÇÃO .....	34
4.2	ANÁLISE DA MASSA CORPORAL, DEPÓSITOS DE GORDURAS E ÓRGÃO, CONSUMO ALIMENTAR E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS EM DECORRÊNCIA DA OBESIDADE-INDUZIDA E EXERCÍCIO FÍSICO.....	35
4.3	TESTES DE TOLERÂNCIA A INSULINA.....	39
4.4	DESCARBOXILAÇÃO DA GLICOSE PELO MÚSCULO SÓLEO E GORDURA PERIGONADAL .....	40
4.5	CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO NO TECIDO MUSCULAR E ADIPOSO .....	43
4.6	EXPRESSÃO PROTEICA NO MÚSCULO SÓLEO E TECIDO ADIPOSO .....	45
4.7	PERCENTUAL DE ÁCIDOS GRAXOS .....	46
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO I. COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. OBESIDADE E ALTERAÇÕES NO METABOLISMO PERIFÉRICO

Nas últimas três décadas a obesidade bem como o número de patologias associadas ao aumento do tecido adiposo tomou níveis alarmantes (NEWTON et al., 2017). Atenção especial vem sendo requerida para as crescentes taxas de obesidade na população mais jovem e em crianças. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015 mais de 42 milhões de crianças com até 5 anos apresentavam sobrepeso e mais de 600 milhões de adultos com mais de 18 anos eram obesos (OMS, [s.d.]). A obesidade é uma doença de causas multifatoriais, em que o estilo de vida (alimentação, sedentarismo) aliado à pré-disposição genética são fatores determinantes para seu desenvolvimento e instalação (VILLANUEVA-ORTEGA; GARCÉS-HERNÁNDEZ; GARIBAY NIETO, 2017; VICKERS, 2014).

Atualmente, sabe-se que as desordens metabólicas instauradas na obesidade contribuem para a crescente taxa de doenças cardiovasculares, hipertensão, hepatosteatoze, diabetes tipo 2, resistência à insulina entre outras doenças (CAO, 2014). A resistência à insulina é processo chave presente em diversas fisiopatologias. Em indivíduos obesos os principais tecidos periféricos (fígado, tecido adiposo e músculo esquelético) relacionados com a homeostase energética apresentam alterações em relação ao estímulo insulínico (CHOE et al., 2016).

A resistência à insulina está relacionada a disfunções no metabolismo energético dos tecidos periféricos, em especial tecido muscular esquelético e adiposo, implicando na alteração da homeostase energética periférica e central (GOODPASTER; SPARKS, 2017). Em indivíduos obesos e resistentes à insulina destaca-se as alterações na homeostase glicêmica e a incapacidade de alternar entre os substratos energéticos utilizados pelos tecidos em estado de jejum e pós-prandial (alimentado) em tecidos como o adiposo e o muscular esquelético. Esta capacidade de alternar entre uso da glicose (estado alimentado, dependente da ação da insulina) e ácidos graxos (em jejum) é denominada de flexibilidade metabólica (MUOIO, 2014; SPARKS et al., 2009).

Neste contexto destaca-se a flexibilidade metabólica do tecido muscular, o qual é responsável pelo consumo da maior parte da glicose ingerida, 70 a 80%, e é

dependente da ação insulínica para captação e posterior metabolização de carboidratos (SPARKS et al., 2009). A musculatura esquelética também desempenha importante papel sobre o metabolismo lipídico, onde no jejum os ácidos graxos representam até 90% da energia fornecida para este tecido. Em condições metabólicas normais os músculos oxidam predominantemente ácidos graxos durante o jejum e alternam para a glicose pós-alimentação. Esse processo de alternar entre os substratos energéticos possibilita que o metabolismo passe do estado catabólico ao anabólico repondo reservas energéticas na musculatura (fígado e tecido adiposo também). A insulina liberada em resposta a alimentação tem papel chave nesta capacidade de alternância. Assim a resistência à ação da insulina implica na inflexibilidade metabólica dos tecidos (GOODPASTER; SPARKS, 2017). Em indivíduos obesos e resistentes à insulina essa capacidade de preferência a diferentes substratos energéticos em jejum e pós-prandial torna-se comprometida (GOODPASTER; SPARKS, 2017; SPARKS et al., 2009).

As disfunções do tecido adiposo não são decorrentes apenas da expansão do tecido, mas a quaisquer condições que afetam seu funcionamento. Visto que o tecido adiposo além de fornecer lipídios como suprimento energético é também importante órgão endócrino central na secreção de moduladores para controle do metabolismo, sua disfunção leva a alterações metabólicas generalizadas (CHOE et al., 2016). No tecido adiposo resistente à insulina fatores secretados por ele para regulação do metabolismo e lipólise encontram-se alterados, associados à condição de estado inflamatório de baixo grau, acúmulo de gordura ectópica e lipotoxicidade. Estas condições favorecem desenvolvimento de desordens metabólicas e instalação de fisiopatologias ligadas ao aumento de peso (GOOSSENS; BLAAK, 2015).

## 1.2. TECIDO ADIPOSO E FISIOPATOLOGIAS NA OBESIDADE

Como órgão endócrino-metabólico o tecido adiposo é capaz de integrar sinais neuroendócrinos, secretar substâncias sinalizadoras que controlam o equilíbrio energético sistêmico, como a leptina, as quais agem em grupos neuronais hipotalâmicos envolvidos na regulação da ingestão alimentar, armazenamento energético e saciedade (BOGUSZEWSKI; PAZ-FILHO; VELLOSO, 2010; CHOE et al., 2016).

Os depósitos de gordura são divididos em três grandes tipos, de acordo com suas características estruturais, funcionais e bioquímicas, sendo: a) O tecido adiposo branco, subdividido em visceral (mesentérica, retroperitoneal e perigonadal) e subcutâneo; b) adiposo marrom (cervical, paravertebral e supraclavicular) e c) tecido adiposo bege, o mais recente tipo de gordura descoberto, formando aglomerados localizados dispersos entre o tecido adiposo branco (CHOE et al., 2016; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

Os diferentes depósitos de tecido adiposo se desenvolvem em períodos distintos ao longo do desenvolvimento. Em roedores os primeiros depósitos a se desenvolver são perigonadal (depósito de gordura visceral) e subcutâneo, sendo o mais tardio, mas logo em seguida outros depósitos de gordura visceral (ou omental). O período de maior expansão dos depósitos de gordura em roedores é logo após o nascimento. Nos humanos o crescimento tem início no segundo trimestre de gestação, havendo depósitos viscerais e subcutâneos bem desenvolvidos logo após o nascimento (GIRALT; VILLARROYA, 2013; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014). O tecido adiposo marrom tem seu desenvolvimento precoce durante a gestação, havendo pico máximo de seu tamanho no nascimento, quando o organismo requer termogênese elevada, e reduz em proporção durante o crescimento em humanos. O tecido adiposo bege deriva das mesmas células precursoras de adipócitos brancos, havendo regulação distinta para sua diferenciação em adipócitos beges (GIRALT; VILLARROYA, 2013).

Na obesidade, a gordura visceral, considerada mais prejudicial, está em maior proporção em relação à subcutânea. A localização destes dois depósitos reflete em diferenças funcionais, nível de mobilização lipídica, maturação e especialmente na produção de adipocitocinas (LE, 2000; TCHKONIA et al., 2013). Os depósitos viscerais apresentam maior atividade lipogênica e lipolítica, além da elevada secreção de citocinas de perfil pró-inflamatório (WRONSKA; KMIEC, 2012).

O ganho de massa adiposa é processo dinâmico e influenciado por fatores nutricionais. O microambiente tecidual sofre alterações quanto ao tipo e número de células que refletem diretamente na funcionalidade desse tecido. Comumente tecidos adiposos obesos apresentam adipócitos hipertróficos associados a infiltrados celulares pró-inflamatórios, expressão de citocinas pró-inflamatórias, ambiente necrótico e hipoxico (CHOE et al., 2016). Citocinas pró- e anti-inflamatórias são

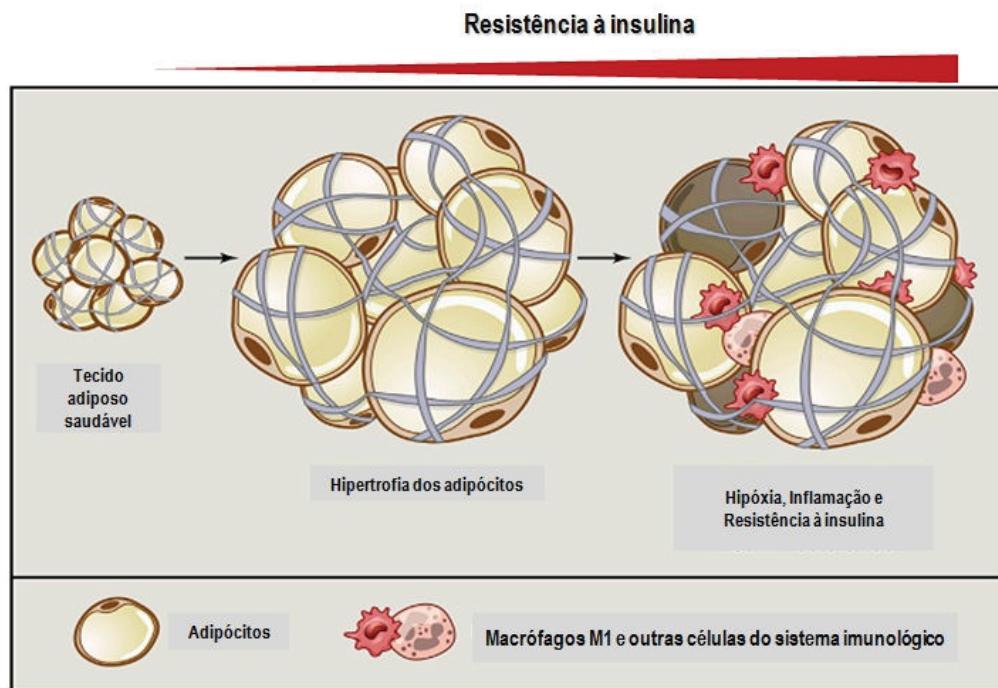
secretadas no tecido adiposo por componentes do sistema imunológico. Destaca-se o desequilíbrio na produção de adipocinas pelo tecido adiposo em expansão patológica. Neste tecido há produção de maneira desequilibrada de citocinas de perfil pró-inflamatórias, como fator-alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1(IL-1), proteína-1 quimioatractora de monócito (MCP-1) e interleucina-6 (IL-6), e reduz-se a produção das adipocinas benéficas como leptina e adiponectina, culminando em processos inflamatórios de baixo grau locais e posteriormente sistêmicos (RAMALHO; GUIMARÃES, 2008; YEA EUN KANG, 2016).

Uma das principais contribuições para perfil pró-inflamatório de citocinas no tecido adiposo obeso é a maior proporção de macrófagos tipo M1 (pró-inflamatório) em relação ao M2 (anti-inflamatório). Condições como remodelação da matriz extracelular, degradação do tecido conjuntivo e proteínas da membrana basal, redução de capilares, necrose de adipócitos e hipoxia também estão associados à disfunção adiposa em obesos (CHOE et al., 2016). Estas alterações refletem em mudanças em nível metabólico e funcional do tecido adiposo, as quais estão associadas à doenças com resistência à insulina pelos tecidos periféricos (CHOE et al., 2016; WRONSKA; KMIEC, 2012). Para Ceperuelo-Mallafré e colaboradores (2016) essas alterações são decorrentes do processo de hipoxia que ocorre no tecido adiposo de obesos. Os autores demonstraram que a hipoxia aumenta a capacidade de armazenamento de glicogênio nos adipócitos e a diferenciação de macrófagos M1, processo que é capaz de modular a expressão de diversos genes envolvidos no processo inflamatório e resistência à insulina (CEPERUELO-MALLAFRÉ et al., 2016). O aumento da massa adiposa se dá pelo aumento da diferenciação de células precursoras dos adipócitos, junto com hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, tendo fatores como o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PPARY) papel crucial na adipogênese, sendo este quem inicia o processo (DHASARATHY; ROEMMICH; CLAYCOMBE, 2017).

O tecido adiposo saudável é responsável à insulina e flexível à disponibilidade de substrato, armazena energia sob a forma de triacilgliceróis quando há substratos plasmáticos disponíveis e libera energia em forma de ácidos graxos livre (lipólise) durante o jejum (SPARKS et al., 2009). Desta forma o tecido adiposo tem papel tecidual chave na indução das alterações metabólicas de tecidos periféricos, em

virtude de suas alterações e sua íntima relação com a resistência à insulina na condição de obesidade.

FIGURA 1 - MUDANÇAS NO TECIDO ADIPOSO OBESO, INCLUINDO HIPOXIA, INFLAMAÇÃO, AUMENTO DE INFILTRADOS E MORTE CELULAR, DESENCADEANDO RESISTÊNCIA À INSULINA.



Adaptado de: (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014)

### 1.3. FISIOPATOLOGIAS DO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO NA OBESIDADE

As características que determinam a flexibilidade metabólica em miócitos são os perfis de ácidos graxos, a aptidão aeróbia e a sensibilidade à insulina (UKROPCOVA et al., 2005). Partindo dessa afirmação, diversos mecanismos podem modular a capacidade metabólica do tecido muscular, das quais o perfil de ácidos graxos circulantes e acúmulo de seus metabólitos, capacidade de respostas mitocondrial além da sensibilidade à insulina neste tecido (KELLEY, 2005).

A liberação de ácidos graxos livres pelo tecido adiposo visceral, sua passagem pelo fígado e liberação sistêmica estão associadas à falta de responsividade à insulina nos tecidos periféricos, em especial musculatura

esquelética (MITTENDORFER, 2011). A resistência muscular esquelética à insulina está associada em muitos trabalhos, à redução da metabolização dos ácidos graxos, absorção e oxidação lipídica (TURCOTTE; FISHER, 2008). Esta parece ser decorrente do acúmulo de tecido adiposo intramuscular e dos intermediários do metabolismo lipídico, como triacilgliceróis, diacilgliceróis, ceramidas e ácido graxo de cadeia longa coenzima A-ligase (LC-FACS), os quais conferem lipotoxicidade a esse tecido intervindo no metabolismo energético adequado (BRUCE et al., 2006; GOODPASTER; SPARKS, 2017; HEGARTY et al., 2003). No entanto, a gordura intramuscular nem sempre está associada a algo ruim, em atletas, por exemplo, há tecido adiposo entre as fibras musculares sem que haja alterações na resposta à insulina (MITTENDORFER, 2011). Dessa forma essa lipotoxicidade relacionada a resistência à insulina parece ser em decorrência de altas taxas de absorção dos ácidos graxos e baixas taxas de oxidação destes, fornecendo lipídios de forma constante para formação de mediadores tóxicos nesse tecido (TURCOTTE; FISHER, 2008). Neste sentido, os ácidos graxos de cadeia média-longa (como ésteres palmítico, esteárico e araquidônico) parecem fornecer intermediários lipídicos que estão mais fortemente associados ao desenvolvimento da resistência à insulina muscular em indivíduos obesos (HOUARD et al., 2002).

#### 1.4. PROGRAMAÇÃO METABÓLICA NA LACTAÇÃO

A obesidade infantil trouxe consigo o adoecimento da população mais jovem, gerando baixa qualidade de vida e altos custos para a saúde pública (BHADORIA et al., 2015). Além dos fatores relacionados às causas da obesidade já citados anteriormente, estudos destas causas buscam compreender como determinados fatores ambientais são capazes de promover “marcações” no organismo, pré-dispondo o indivíduo a condições patológicas como a obesidade, quando este estiver exposto a meio favorável. Dentre estes fatores a influência da nutrição e tipos de nutrientes ingeridos tem ganhado destaque. O estado nutricional exerce grandes efeitos sobre o desenvolvimento, especialmente em períodos de grande diferenciação celular e crescimento tecidual, como fase pré-natal e pós-natal. Condições como subnutrição ou consumo de dieta altamente energética estão

associadas a distúrbios metabólicos, em especial alterações no metabolismo lipídico e obesidade (DHASARATHY; ROEMMICH; CLAYCOMBE, 2017).

Fatores genéticos sem dúvida apresentam papel central na gênese da obesidade, no entanto, a suscetibilidade gênica parece estar associada a condições ambientais que a permitem se manifestar (BHADORIA et al., 2015). Neste contexto, diversos trabalhos têm abordado que a pré-disposição à obesidade tem suas origens durante períodos críticos do desenvolvimento (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015). Períodos em que há intensa migração celular, diferenciação tecidual e estabelecimentos de vias metabólicas são considerados vulneráveis e tidos como períodos de programação do metabolismo. Nestes períodos, o organismo torna-se mais propenso a sofrer alterações epigenéticas, como metilações no DNA e/ou modificações na cauda das histonas, o que leva à expressão diferenciada de certos genes (VICKERS, 2014).

Dentre os períodos em que o organismo torna-se mais suscetível a sofrer com intervenções destacam-se os primeiros estágios do desenvolvimento, a gestação e a lactação, onde a exposição a agentes ambientais ou intervenções nutricionais pode intervir acarretando doenças futuras (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015). No entanto, as consequências trazidas ao organismo são dependentes de fatores tais como o tipo, duração, período, gravidade da exposição e se há limitação gênero específico (PICÓ et al., 2012).

O período pós-natal imediato (amamentação) é complementar ao desenvolvimento de órgãos que ainda continuam a se desenvolver na maioria dos mamíferos (PATEL; SRINIVASAN, 2011). Nesta fase o organismo do neonato passa a sofrer influências da própria alimentação. Na lactação, período que dá continuidade à nutrição intra-uterina, se estabelecem vias metabólicas importantes, ocorre grande diferenciação de células adiposas, maturação de regiões do hipotálamo responsáveis pelo controle fome/saciedade e das funções neuroendócrinas (PLAGEMANN et al., 1999).

Devido às limitações em estudos com humanos, modelo animais de obesidade são utilizados para compreender as disfunções metabólicas na condição de obesidade. Dentre os modelos animais de obesidade está a programação metabólica por redução do número de prole por ninhada, o qual vem sendo amplamente explorado em pesquisas. Utilizado primariamente pelos pesquisadores

Widdowson e McCance (1960) e Kennedy (1957), este modelo permite abordar as consequências metabólicas e neuroendócrinas promovidas pelo elevado aporte energético durante a primeira infância (GC, 1957; WIDDOWSON; MCCANCE, 1960). Regiões hipotalâmicas de animais com maior ingestão calórica apresentam alterações nos circuitos neuronais hipotalâmicos envolvidos no balanço energético. Tais alterações estão intimamente relacionadas à concentração e a ação dos hormônios leptina e insulina sobre o núcleo arqueado pós-nascimento. Em conjunto, as alterações hipotalâmicas e em tecidos periféricos conferem características como dislipidemia, resistência à insulina, hiperfagia, hiperglicemia e aumento da adiposidade nestes animais (PLAGEMANN et al., 1999).

Mudanças epigenéticas podem causar alterações na expressão de determinado gene, alterando o fenótipo sem que necessariamente haja alterações em nível estrutural de DNA. Os processos epigenéticos podem ocorrer por metilações de certas áreas do DNA (especificamente regiões 5' com pares C-G), acetilação e desacetilação de histonas (mudando compactação da cromatina), micro RNAs (DHASARATHY; ROEMMICH; CLAYCOMBE, 2017). Sabe-se que o tipo de nutriente ingerido pelo indivíduo ou pela mãe durante a gestação exerce papel central na modulação dos eventos epigenéticos. Além da alimentação outros fatores como fatores aos quais somos expostos ou ainda o estilo de vida que levamos também são capazes de modulação da expressão gênica (DHASARATHY; ROEMMICH; CLAYCOMBE, 2017).

## 1.5. EXERCÍCIO FÍSICO

Durante e após a prática de exercício físico diversos mecanismos estão ativos para suprir a demanda energética elevada. Exercícios vigorosos podem exceder em até 25 vezes a taxa metabólica basal, assim os efeitos moduladores sobre os parâmetros metabólicos são dependentes da intensidade e duração durante a prática do exercício físico (GOODPASTER; SPARKS, 2017). A glicogênese é elevada após a prática de exercício físico, restabelecendo as reservas de glicogênio com consequente redução da glicose plasmática. Na obesidade e diabetes tipo 2, em função da resistência à insulina, o conteúdo do glicogênio nos músculos

esqueléticos torna-se reduzido, tem-se aumento da glicose plasmática e mais substrato para síntese de lipídios (JENSEN et al., 2011).

Além dos efeitos benéficos sobre parâmetros metabólicos como a redução no ganho de peso, melhora da composição corporal (aumento da massa magra em relação à gordura), melhora do perfil lipídico plasmático e glicemia de jejum, melhor sensibilidade à insulina (SHAIBI et al., 2015; SPERETTA et al., 2012), a prática de exercício físico também tem efeitos positivos sobre a socialização e melhor aproveitamento do sono. No entanto é importante salientar que os efeitos positivos do exercício sobre o metabolismo somente são sustentados quando aliado à alimentação saudável (SHAIBI et al., 2015).

No tecido adiposo a flexibilidade metabólica no exercício está relacionada à capacidade deste em mobilizar ácidos graxos por meio da lipólise (HANSEN et al., 2007). Há mobilização em especial do tecido adiposo visceral, mais sensível a ação das catecolaminas (aumento atividade simpática durante exercício), em virtude de apresentar maior número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, mais sensível ao cortisol e menos sensível aos efeitos anti-lipolíticos da insulina em relação ao tecido subcutâneo (BAGCHI; NAIR, 2012). Para suprir toda atividade basal elevada dos tecidos periféricos em resposta ao exercício, os tecidos sofrem remodelação quanto a seus constituintes celulares, os quais convergem para maior responsividade à insulina e a maior flexibilidade metabólica (GOODPASTER; SPARKS, 2017). No músculo o processo contrátil eleva a concentração de cálcio intracelular (necessário para o processo acoplamento-contração), o influxo de cálcio ativa vias promovendo a translocação de fatores de transcrição gênicos ao núcleo. Alguns desses fatores são responsáveis por elevar a expressão de transportadores de glicose, enzimas glicolíticas, biogênese mitocondrial e oxidação de ácidos graxos (MANSUETO et al., 2017).

O exercício físico é capaz de promover alterações modulando eventos epigenéticos, reduzindo o risco de obesidade e outras doenças. Durante e após a prática de exercício diversas enzimas responsáveis pela metilação do DNA e modulação da cromatina são ativas, refletindo em uma série de adaptações metabólicas favoráveis à saúde do indivíduo. Tanto no tecido muscular quanto no adiposo o exercício físico tem efeitos benéficos. O exercício é capaz de agir sobre as metilações em regiões de 21 possíveis genes relacionadas ao desenvolvimento

de Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e 18 possíveis genes da obesidade podendo silenciar alguns destes genes, afetando o metabolismo dos adipócitos e a adipogênese (DHASARATHY; ROEMMICH; CLAYCOMBE, 2017; GOODPASTER; SPARKS, 2017).

A prática de exercício físico contribui para perda da massa adiposa, restabelecimento de padrões normais morfológicos (tamanho celular) do tecido adiposo, aumento da atividade mitocondrial, alterações no estroma do tecido (diversos tipos celulares, das quais células do sistema imunológico) desse tecido que culminam na melhora do perfil inflamatório sistêmico e metabólico (STANFORD; MIDDELBEEK; GOODYEAR, 2015).

Jensen e colaboradores vêm estudando a relação entre conteúdo de glicogênio muscular e a sensibilidade à insulina desde 1997, e demonstraram que há relação inversa entre o conteúdo de glicogênio e a absorção de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético do rato. (JENSEN et al., 2011). O músculo com menor conteúdo de glicogênio apresenta maior responsividade à insulina (estímulo do transporte de glicose) comparada à musculatura com conteúdo de glicogênio normal e alto (JENSEN et al., 2011). O conteúdo de glicogênio muscular regula a síntese de glicogênio estimulado pela insulina, o fluxo glicolítico e parece exercer efeitos sobre a translocação do GLUT4 (JENSEN et al., 2006). Os autores relacionam a redução na síntese de glicogênio estimulada por insulina em indivíduos com elevado teor de glicogênio (JENSEN et al., 2006, 2011; JENSEN; LAI, 2009).

A melhora na sensibilidade imediata à insulina após prática de exercício físico é associada ao aumento da expressão de GLUT4, hexoquinase II e glicogênio sintase (GS), envolvidas no metabolismo da glicose estimulada por insulina. Os mecanismos de sinalização que culminam na maior sensibilidade à insulina e aumento da captação de glicose por longos períodos após exercício ainda não são totalmente conhecidos, mas parecem estar relacionados a esse mecanismo de renovação dos estoques de glicogênio muscular além do aumento na expressão e fosforilação de proteínas chave das vias de sinalização (JENSEN et al., 2011).

O processo de desenvolvimento da resistência à insulina é gradual, e parece ter várias frentes, dificultando a compreensão do processo. Elevada quantidade de glicose e gordura (aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio) fornecidos constantemente e acúmulo de intermediários lipídicos são os principais contribuintes

para instalação da resistência à insulina (HUE; TAEGTMEYER, 2009; JENSEN et al., 2011).

Em suma, várias pesquisas são realizadas objetivando melhor entendimento das causas da obesidade e de que forma intervenções em períodos críticos ao desenvolvimento do organismo, em especial intervenções nutricionais, podem contribuir na gênese da obesidade. Embora já esteja confirmado na literatura que as intervenções nutricionais na fase da lactação acarretam em alterações metabólicas que intervêm na saúde do indivíduo, alguns dados, inclusive, mostram-se contraditórios. Em especial, há carência de informações sobre os efeitos da programação metabólica durante a lactação sobre as disfunções metabólicas que ocorrem no tecido adiposo e no tecido muscular esquelético.

Desta forma, o presente trabalho investigou os efeitos da programação metabólica pela redução de ninhada sobre o metabolismo da glicose pelo tecido adiposo e muscular esquelético de ratos obesos-induzidos. Adicionalmente, diante da importância de medidas preventivas ao desenvolvimento da obesidade, este trabalho buscou ainda avaliar de que forma o exercício físico, iniciado precocemente, pode contribuir na contenção das disfunções metabólicas no tecido adiposo branco e muscular esquelético no modelo de programação metabólica por redução de ninhada.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

Avaliar as alterações no metabolismo da glicose no tecido muscular esquelético e adiposo visceral em ratos obesos-induzidos por redução de ninhada submetidos ou não ao exercício físico precoce crônico.

### 2.2. ESPECÍFICOS

1. Acompanhar o ganho de massa corpórea e do Índice de Lee durante lactação;
2. Determinar o ganho de massa corpórea ao longo do crescimento, deposição de gordura visceral e resistência à insulina aos 90 dias de vida.
3. Determinação da glicemia, triacilglicerolemia, colesterolemia aos 90 dias de vida.
4. Identificar e quantificar ácidos graxos total no plasma, fígado e depósitos de gordura visceral (mesentérica, retroperitoneal e perigonadal) aos 90 dias de vida.
5. Avaliar *in vitro*, a metabolização da glicose estimulada por insulina no músculo esquelético e no tecido adiposo branco de ratos sedentários e exercitados obesos ou não.
6. Quantificar no músculo esquelético e tecido adiposo branco a expressão de proteínas GLUT4 e PPAR $\gamma$  de ratos sedentários e obesos exercitados ou não.
7. Quantificação de glicogênio muscular e adiposo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Todos os protocolos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA número 865/2015, Anexo I). Os animais foram alojados sob ciclo invertido claro/escuro (12:12 h), a 23 ± 1°C, com acesso livre a água e ração (Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR). Para reprodução foram utilizados no total 30 fêmeas e 10 machos, os quais foram divididos em duas remessas, tendo como número final 160 ratos machos, subdivididos em 4 grupos experimentais de 39 a 41 animais por grupo.

#### 3.2. INDUÇÃO DA OBESIDADE

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus, var. albinus*), obtidos a partir do acasalamento de fêmeas nulíparas adultas (90 dias). Para o acasalamento os animais foram acomodados em proporção de 3 fêmeas e 1 macho. Após o nascimento dos filhotes, no primeiro dia após o nascimento, todas as ninhadas foram padronizadas para 10 filhotes por progenitora. Foram utilizadas apenas as ninhadas com 9-12 filhotes, para evitar a possível discrepância na massa corporal. A indução da obesidade ocorreu pela redução do número de filhotes no terceiro dia pós-natal. As ninhadas foram divididas em grupo controle (C – permaneceram com 10 filhotes) e grupo obeso-induzido (OB- tiveram redução para 3 filhotes). Durante o período da lactação, quando foi insuficiente o número de machos, foram utilizadas fêmeas para completar o número de filhotes por ninhada. Completados os 21 dias de vida, os filhotes machos foram desmamados, subdivididos em 4 grupos experimentais (descrito a seguir), e alocados em número de 4 ratos por caixa. A indução de obesidade por redução de ninhada seguiu protocolo previamente publicado (FISCHER, 2015).

### 3.3. PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Após o desmame os grupos experimentais Controle (C) e Obeso-induzido (OB) foram subdivididos aleatoriamente em: Controle Sedentários (CS), Controle Exercitado (CE), Obeso-induzido Sedentário (OBS) e Obeso-induzido Exercitado (OBE). O protocolo de natação utilizado foi o proposto por Gobatto e colaboradores, (2001), e adaptado por Fischer e colaboradores (2015). O protocolo de treinamento consistiu em natação, realizada 3 vezes/semana com duração de 30 minutos cada sessão. As primeiras três semanas de treino consistiram em fases de adaptação, da seguinte maneira: 1<sup>a</sup> semana- os animais permaneceram em meio líquido por 5, 15 e 30 minutos; 2<sup>a</sup> semana- cada sessão de treino teve 30 minutos com adição de peso de 2% do peso corporal individual acrescido à cauda; 3<sup>a</sup> semana- a partir da terceira semana as natações permaneceram com 30 minutos de duração e adição de peso a 5% do peso corporal individual. Os grupos exercitados treinaram dos 22 aos 90 dias de vida. As piscinas foram adaptadas para ratos, e cada animal nadou em ambiente isolado (FIGURA 2). A temperatura da água foi mantida a  $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . As sessões de natação tiveram início entre 8 e 9 horas. Todos os protocolos experimentais foram realizados 48 horas após a última sessão de natação.

FIGURA 2 - PISCINAS ADAPTADAS PARA NATAÇÃO



FONTE: BRITO, 2012.

### 3.4. EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL

O ganho de massa corporal (g) foi avaliado durante a lactação e após o desmame, por meio da construção da curva de crescimento. Durante a lactação as ninhadas foram pesadas aos 7, 14 e 21 dias. Dos 22 aos 90 dias de vida, os animais foram pesados individualmente, 3 vezes na semana para construção da curva de crescimento de seus respectivos grupos experimentais.

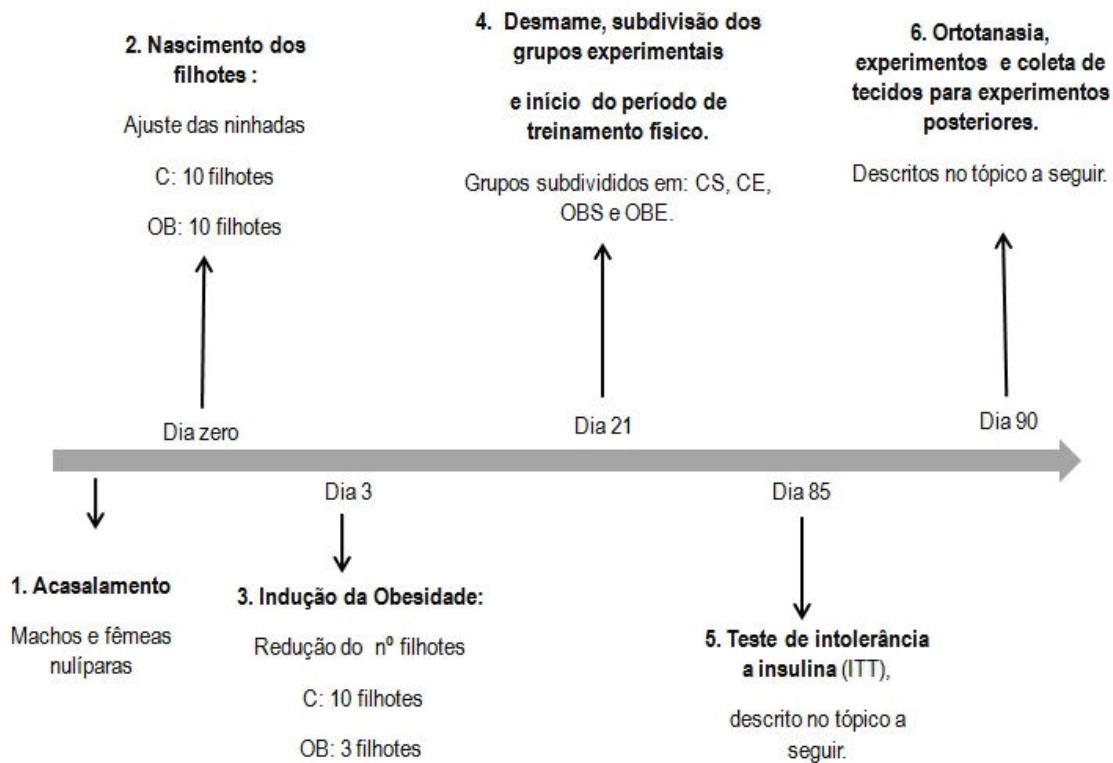
### 3.5. CONSUMO ALIMENTAR

O consumo alimentar foi avaliado dos 22 aos 90, 3 vezes na semana. O consumo alimentar foi mensurado pelo seguinte cálculo: comida ofertada – sobras/ número de animais por caixa, expresso em gramas.

### 3.6. TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)

O ITT foi realizado aos 85 dias de vida, 48 horas após a última sessão de natação e 8-12 horas em jejum. Solução de insulina de 1U/kg (Humulin ®) foi administrada intraperitonealmente. Por meio de um pique na cauda dos animais, amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 0 (basal- antes da administração de insulina), 5, 10, 15, 20 e 25 minutos e a glicemia determinada por tiras teste aplicadas ao glicosímetro (OneTouch®). Os valores obtidos foram utilizados para cálculo da constante de decaimento da glicose plasmática (Kitt)(VENTURELLI et al., 2015).

FIGURA 3 - LINHA TEMPORAL



FONTE: O autor.

### 3.7. AVALIAÇÃO DA OBESIDADE

A obesidade foi avaliada pelo Índice de Lee e pesagem dos depósitos das gorduras viscerais. O IL ( $\frac{\text{peso corporal(g)}}{\text{comprimento naso-anal}}$ ) foi cálculo aos 21 e 90 dias de vida (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). Os depósitos de gorduras viscerais (mesentérica, perigonadal e retroperitoneal) foram dissecados aos 90 dias após ortotanásia, pesados e expressos em g/100 gramas de peso corporal. Órgãos como fígado, coração, rins e adrenais também foram dissecados e pesados (expressos em g/100 gramas de peso corporal).

### 3.8. DOSAGENS BIOQUÍMICAS PLASMÁTICAS

As dosagens das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis (mg/dL), colesterol total (mg/dL) e glicose (mg/dL) foram realizadas utilizando-se kits

comerciais (Vida biotecnologia®), por método enzimático colorimétrico, conforme instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Infinite® 200 Pro series TECAN) e os resultados expressos em mg/dL.

### 3.9. INCUBAÇÃO DE MÚSCULO SÓLEO E GORDURA PERIGONADAL COM D-[U-<sup>14</sup>C] GLICOSE E DA 2-DESOXI- D- [<sup>3</sup>H] GLICOSE

Amostras de gordura perigonadal (20-30 mg) de ambos os lados e do músculo sóleo (20-30 mg) de ambas as patas foram rápida e cuidadosamente isoladas (WALLBERG-HENRIKSSON, 1987). Em seguida foram pré-incubadas em tampão bicarbonato de Krebs-Ringer durante 30 minutos, gaseificado com 95% O<sub>2</sub>/ 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, contendo glicose 5,6 mM e pH 7,4. Após este período, os tecidos foram incubados durante 1 hora, em erlenmeyers (25 ml) contendo 3,0 mL de tampão bicarbonato de Krebs-Ringer com 1% de albumina de soro bovino livre de gordura, 5,6 mM de glicose, acrescido de 0,1 µCi / mL de D-[U-<sup>14</sup>C] glicose e 0,1 µCi / ml de 2-desoxi-D-[<sup>3</sup>H] glicose (apenas para músculo sóleo), na ausência ou na presença de 10 mU/ ml de insulina. A dose de insulina utilizada foi pré-estabelecida por curva dose-resposta (BRITO, 2012). Após 1 hora de incubação, os tecidos e o meio de incubação foram armazenados em freezer -80°C para posterior análise: a) do meio de incubação (lactato total e lactato radiomarcado produzidos pelos tecidos muscular e adiposo incubados); b) do tecido muscular incubado (conteúdo total de 2-desoxi-D-[<sup>3</sup>H] glicose)(FIGURA 4).

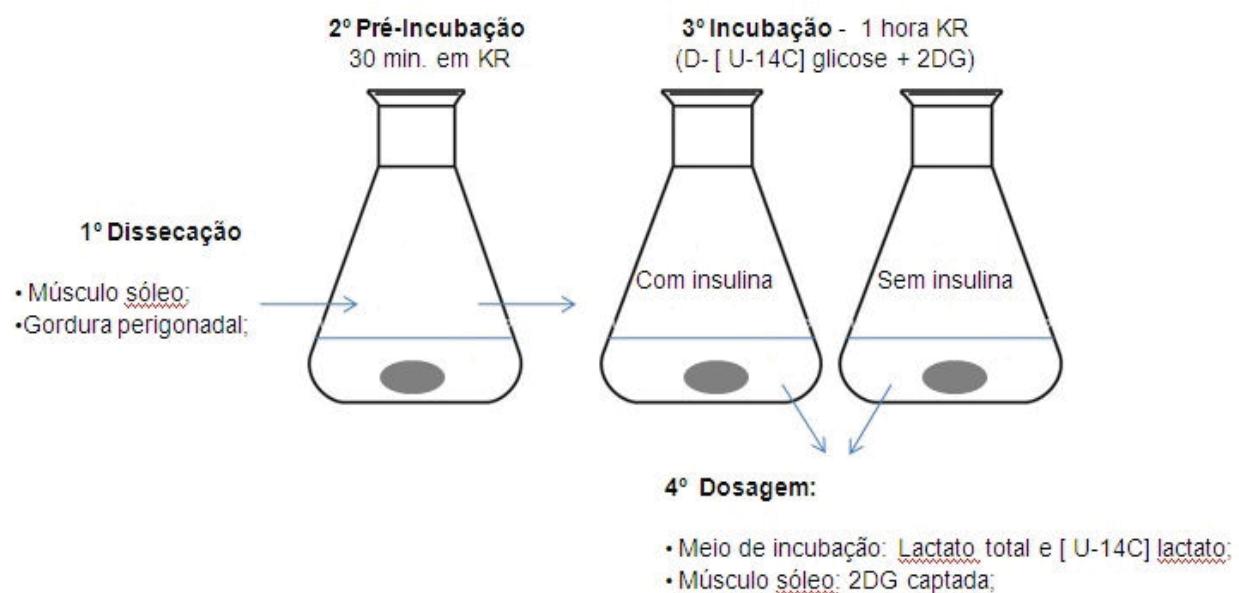
#### 3.9.1. Produção de Lactato total e [U-<sup>14</sup>C] lactato

Foram dosados o lactato total e [U-<sup>14</sup>C] lactato (a partir da oxidação da D-[U-<sup>14</sup>C] glicose) produzidos pelo tecido muscular e adiposo acumulado na solução de incubação, sendo o primeiro por espectrofotometria e o segundo por cintilação (ENGEL; JONES, 1978; LEIGHTON; COOPER, 1989).

### 3.9.2. Captação de 2-Deoxy-D-[3H] glicose no músculo sóleo.

O músculo sóleo incubado foi dissolvido em 0,5 mL de 1 M KOH (Cuendt et al., 1976). Alíquotas foram utilizadas para dosagem da captação da glicose radiomarcada utilizando-se contador de cintilação (contador beta Beckman-LS 6000 ic Liquid Scintillator)(LEIGHTON e COOPER, 1988).

FIGURA 4 - PROCESSO DE INCUBAÇÃO DOS TECIDOS



### 3.10. CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO

O conteúdo de glicogênio foi mensurado em amostras de músculo sóleo e dos depósitos de gordura (mesentérica, retroperitoneal e perigonadal) a fresco (logo após dissecção), e do músculo sóleo incubado após 1 hora (amostras do tópico anterior 3.9). As amostras de tecido adiposo (100 mg) e dos músculos incubados (20-30 mg) foram digeridos em KOH e posteriormente submetidas a reações em tampão contendo amiloglucosidase. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (mg/100mg de tecido) Método descrito por (CUENDT et al., 1976; LEIGHTON e COOPER, 1988).

### 3.11. IDENTIFICAÇÃO E PERCENTUAL DE ÁCIDOS GRAXOS DETERMINADOS POR HPLC

O percentual de ácidos graxos nas gorduras viscerais (mesentérica, retroperitoneal e perigonadal, 0,050 g), plasma (100 µL) e fígado (0,50 g), foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography- HPLC). O método de extração lipídica utilizado foi o descrito por (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957). As amostras foram homogeneizadas em clorofórmio: metanol (2:1 v/v), e ao sobrenadante adicionou-se 0,24 mL de metanol para precipitação de proteínas. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 2500 rpm (centrifuga Eppendorf modelo 5810R). A fase superior (hidrometanólica) foi transferida para outro tubo de ensaio com adição de 0,48 mL de clorofórmio e 0,41 mL de água. Após a formação espontânea de sistema bifásico houve a eluição da fração hidrometanólica por adição e remoção da solução de Folch (clorofórmio:metanol:água, 3:48:47 v/v). Os extratos já eluidos foram secos em nitrogênio gasoso. Na fase de saponificação os extratos lipídicos foram ressuspensos em metanol e NaOH, em seguida homogeneizados e incubados a 37°C por 2 horas. As amostras foram acidificadas por HCl (pH3,0), posteriormente os lipídios foram extraídos pela adição e remoção de hexano formando a fase sobrenadante, a qual foi coletada. Para detecção em cromatógrafo líquido de alta precisão (HPLC), os ácidos graxos foram ressuspensos em acetonitrila e derivatizados usando Bromometil-Metóxi-Coumarin (BMMC) (1 mg/mL), a 60° C por 15 minutos (ABUSHUFA; REED; WEINKOVE, 1994). Uma vez eluídos, os ácidos graxos foram detectados pelo detector de fluorescência, com excitação (emissão) em 325nm e excitação 398 nm (cromatógrafo líquido Varian Pró-Star).

### 3.12. WESTERN BLOTTING

Amostras de tecido muscular esquelético (sóleo), gordura mesentérica e retroperitoneal de todos os grupos experimentais foram armazenadas em solução tampão para estudo da expressão de proteínas (Uréia 7M; Tiuréia 2M; E.D.T.A. 5mM; Triton x-100 1%; Fluoreto de Sódio 100mM; Ortovanadato de Sódio 100mM; Pirofosfato de Sódio 100mM; Aprotinina 1mg/mL e PMSF 1 mmol/L). Para se

determinar o total de proteínas utilizou-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Amostra de 50 µg de extrato proteico foi submetido a dodecil sulfato de sódio-gel de poliacrilamida 7,5% (SDS-PAGE), no equipamento Bio-rad Mini-PROTEAN (TOWBIN; GORDON., 1979). Posteriormente foi realizada a transferência das proteínas em membrana de nitrocelulose. As membranas foram então incubadas com anticorpos para GLUT4 (monoclonal, diluição 1:500 uL, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e PPAR $\gamma$  (policlonal, concentração 1mg/mL, Abcans). As diluições de anticorpos foram feitas de acordo com as instruções do fabricante em tampão TRIS-Tween contendo 30 g/L de leite em pó desnatado. As incubações com anticorpos primários foram overnight seguidas de 1 hora e 30 minutos de incubação com anticorpo secundário (diluição 1:20.000 µL, Sigma). Detecção de banda foi realizada por quimioluminescência (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), anticorpo secundário conjugado com HRP (Horseradish peroxidase). Intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica (Imagen J, National Institutes of Health, EUA). Para controle interno dos ensaios (housekeeping), foi utilizado anticorpo comercial anti  $\beta$ -actina (1:500- Sigma).

### 3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

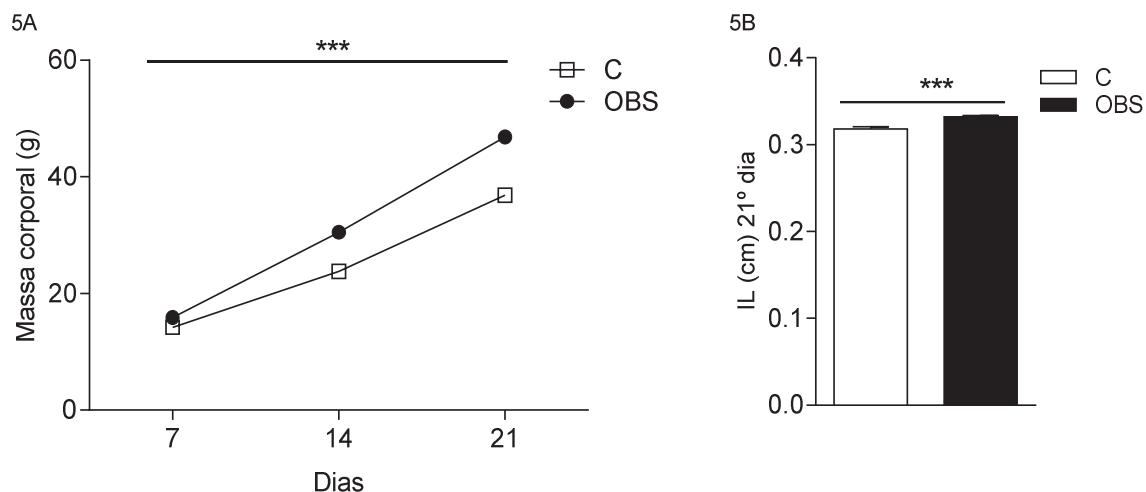
Os testes estatísticos foram realizados usando o GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Aplicou-se o teste de normalidade D'Agostinho Pearson para a verificação da distribuição normal. Foi utilizado teste estatístico ANOVA de duas vias (two way-ANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni, tendo como fatores obesidade e exercício, ou teste t de Student's quando indicado. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. tendo  $p<0,05$  para indicar significância estatística.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERÍSTICAS DAS NINHADAS NO PERÍODO DA LACTAÇÃO

Animais de ninhadas reduzidas, obesos-induzidos (OB) apresentaram aumento da massa corpórea a partir do 7 dia (24%), sendo mantido esse aumento no 14 dia (38%) e 21 dias (31%) (FIGURAS 5A). No desmame, 21 dias (FIGURA 5B) o índice de Lee (IL) apresentou aumento em 3,72% nos animais obesos-induzidos ( $p<0,05$  vs. C).

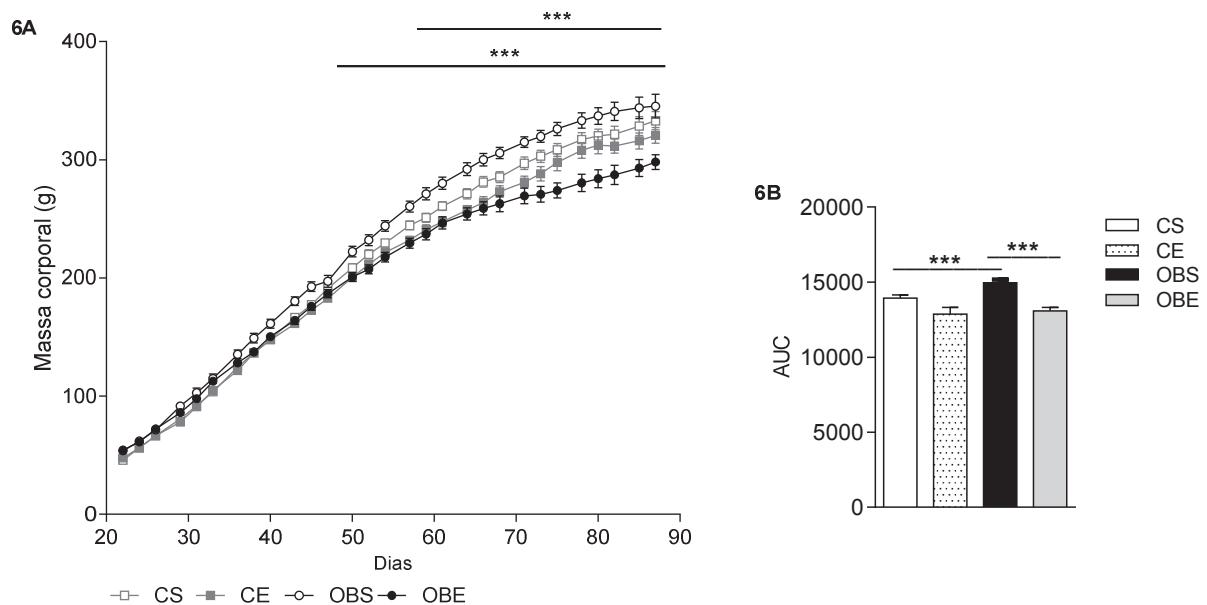
FIGURA 5 - MASSA CORPÓREA AOS 7, 14 E 21 DIAS (5A) E ÍNDICE DE LEE (IL) AOS 21 DIAS DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE (C) E NINHADA REDUZIDA OBESO-INDUZIDA (OBS). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM (79-81 RATOS POR GRUPO). \*\*\* $P<0.001$ VS. OBS.



#### 4.2. ANÁLISE DA MASSA CORPORAL, DEPÓSITOS DE GORDURAS E ÓRGÃO, CONSUMO ALIMENTAR E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PLASMÁTICOS EM DECORRÊNCIA DA OBESIDADE-INDUZIDA E EXERCÍCIO FÍSICO.

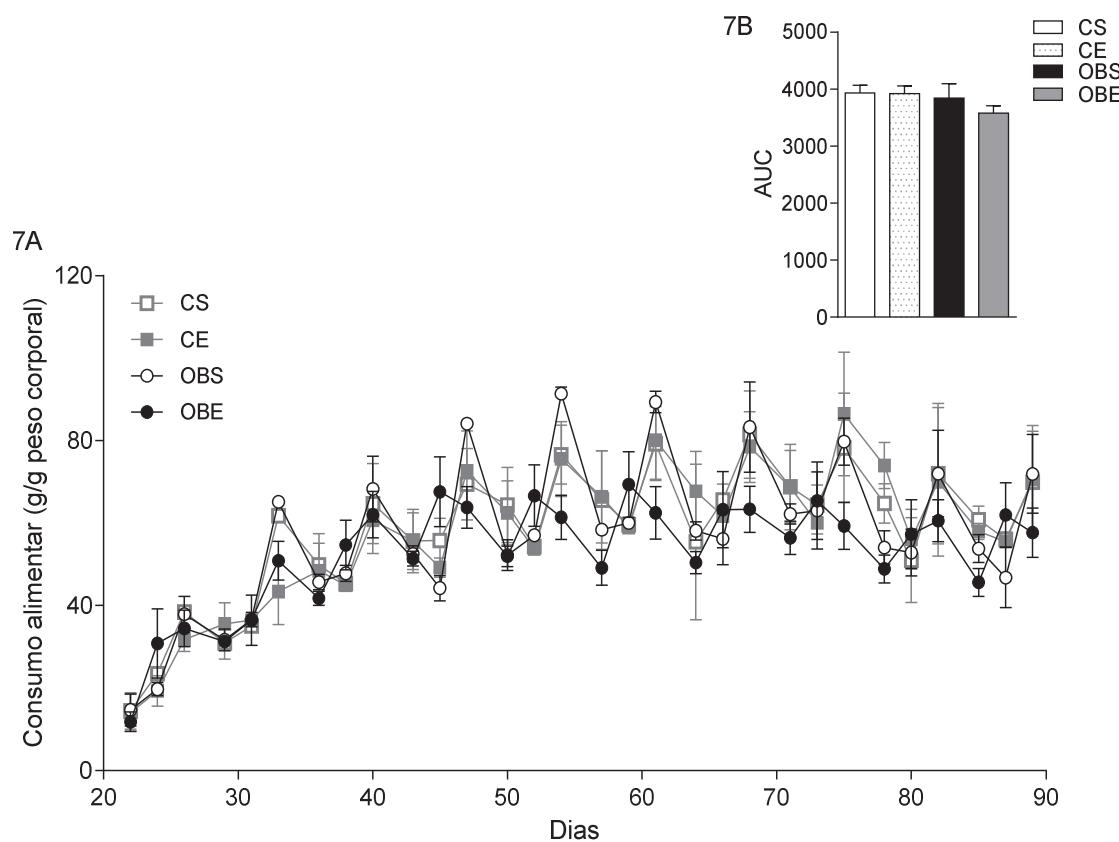
Os ratos obesos-induzidos sedentários (OBS) apresentaram aumento da massa corporal a partir dos 60 dias (Figura 6A) quando comparado ao do controle sedentário ( $p < 0,05$  CS vs. OBS). O exercício conteve o ganho de massa corporal no grupo obeso-induzido exercitado ( $p < 0,05$  OBS vs. OBE). De 22 a 90 dias de idade (FIGURA 6B), a área sob a curva (AUC) de ratos obesos-induzidos sedentários (OBS) foi 7,4% maior em relação à do controle (CS). Nos ratos obesos-induzidos exercitados (OBE), a AUC foi 12,4% menor do que a dos obesos-induzidos sedentários (OBS). O IL aos 90 dias não apresentou diferença estatística entre os grupos (dados não apresentados).

FIGURA 6 - MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE SEDENTÁRIOS (CS), EXERCITADOS (CE), OBESOS-INDUZIDOS SEDENTÁRIOS (OBS) E OBESOS-INDUZIDOS EXERCITADOS (OBE), MENSURADA DOS 22 AOS 89 DIAS (A) E (B) ÁREA SOB A CURVA (AUC). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM DE 39 - 41 RATOS POR GRUPO. \*\*\* $P < 0,001$ , CE E OBS VS. CS; \*\*\* $P < 0,001$ , OBE VS. OBS.



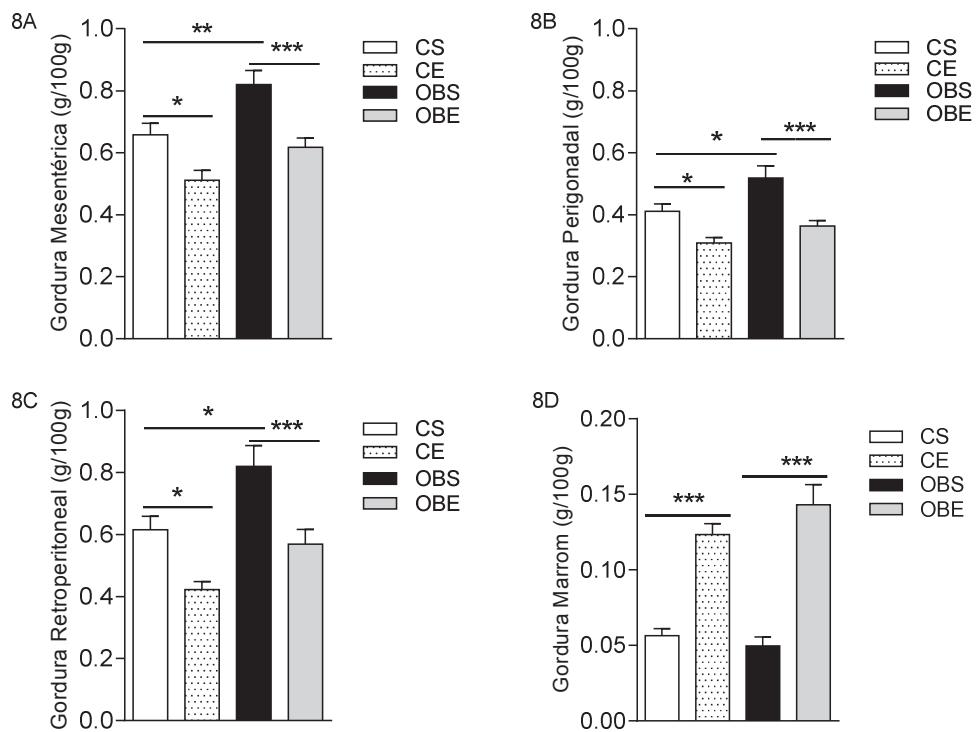
Não houve diferença no consumo alimentar entre os grupos no período de 22 a 89 dias (FIGURA 7).

FIGURA 7 - INGESTÃO ALIMENTAR DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE SEDENTÁRIOS (CS), EXERCITADOS (CE), OBESOS-INDUZIDOS SEDENTÁRIOS (OBS) E OBESOS-INDUZIDOS EXERCITADOS (OBE), MENSURADA DOS 22 AOS 89 DIAS INGESTÃO ALIMENTAR DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE SEDENTÁRIOS (CS), EXERCITADOS (CE), OBESOS-INDUZIDOS SEDENTÁRIOS (OBS) E OBESOS-INDUZIDOS EXERCITADOS (OBE), MENSURADA DOS 22 AOS 89 DIAS.



Aos 90 dias de idade, o grupo de obesos-induzidos sedentários (OBS) tiveram aumento de 62,5% na gordura mesentérica (Fig. 8A,  $p < 0,001$ ), 26% na perigonadal (Fig. 8B,  $p < 0,05$ ) e 47,8% nos depósitos de gordura visceral retroperitoneal (Fig. 8C,  $p < 0,05$ ) em comparação com o controle sedentário (CS). Ambos os grupos exercitados (CE e OBE), tiveram redução dos depósitos de gordura mesentérica (28,7%,  $p < 0,05$  e 33,7%,  $p < 0,001$ ), perigonadal (24,3%,  $p < 0,05$  e 23,7%,  $p < 0,001$ ) e retroperitoneal (24,5%,  $p < 0,05$  e 23,7%,  $p < 0,001$ ) em relação aos seus respectivos grupos sedentários (CS e OBS). Na gordura marrom os grupos CE (118%) e OBE (187%) apresentaram aumento de peso em comparação com CS e OBS ( $p < 0,001$ ), respectivamente (FIGURA. 8D).

FIGURA 8 - PESO DAS GORDURAS VISCERAIS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE SEDENTÁRIOS (CS), EXERCITADOS (CE), OBESOS-INDUZIDOS SEDENTÁRIOS (OBS) E OBESOS-INDUZIDOS EXERCITADOS (OBE), MENSURADAS NO MESENTÉRIO (A), PERIGONAL (B), RETROPERITONEAL (C) E TECIDO ADIPOSO MARROM (D). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  SEM DE 39-41 RATOS POR GRUPO. COMPARAÇÕES: CE VS. CS; OBS VS. CS; OBE VS. OBS, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$ .



A massa (peso úmido) da glândula adrenal, rim, fígado e coração foram mensuradas, havendo diferença apenas na massa do coração dos grupos exercitados, em que no CE aumentou em 8,8% ( $p < 0,05$ ) e OBE aumentou em 9,1% ( $p < 0,05$ ) em comparação a massas dos grupos CS e OBS, respectivamente, (tabela 1).

TABELA 1. PESO ÚMIDO DA GLÂNDULA ADRENAL, RIM, CORAÇÃO E FÍGADO DOS ANIMAIS CONTROLE SEDENTÁRIOS(CS), EXERCITADOS (CE), OBESOS-INDUZIDOS (OBS) E OBESOS-INDUZIDOS EXERCITADOS (OBE) AOS 90 DIAS. OS VALORES SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM (39-41 RATOS POR GRUPO). \*  $P < 0,05$  VS. CS; # $P < 0,05$  VS. OBS.

Tecido	CS	CE	OBS	OBE
Adrenal	0,007344 $\pm$ 0,00034	0,0075 $\pm$ 0,00051	0,006888 $\pm$ 0,00028	0,006888 $\pm$ 0,00028
Rim	0,3360 $\pm$ 0,00468	0,3332 $\pm$ 0,00531	0,3304 $\pm$ 0,00419	0,3313 $\pm$ 0,00394
Coração	0,3443 $\pm$ 0,01090	0,3746 $\pm$ 0,00865*	0,3587 $\pm$ 0,00697	0,3915 $\pm$ 0,01078#
Fígado	2,762 $\pm$ 0,08571	2,845 $\pm$ 0,09975	2,862 $\pm$ 0,07213	2,908 $\pm$ 0,06364

A concentração plasmática de glicose, triacilglicerol e colesterol total está apresentada na tabela 2. A glicemia e a triacilglicerolemia não foram diferentes entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O exercício (CE) promoveu redução na concentração do colesterol total no grupo CS de 6,5%, o que foi significativo ( $p < 0,05$ ) em comparação à do grupo controle sedentário (CS). Entre os grupos obesos-induzidos não houve diferença na concentração plasmática de colesterol total ( $p > 0,05$ ), bem como comparado aos respectivos grupos sedentários ( $p > 0,05$ ).

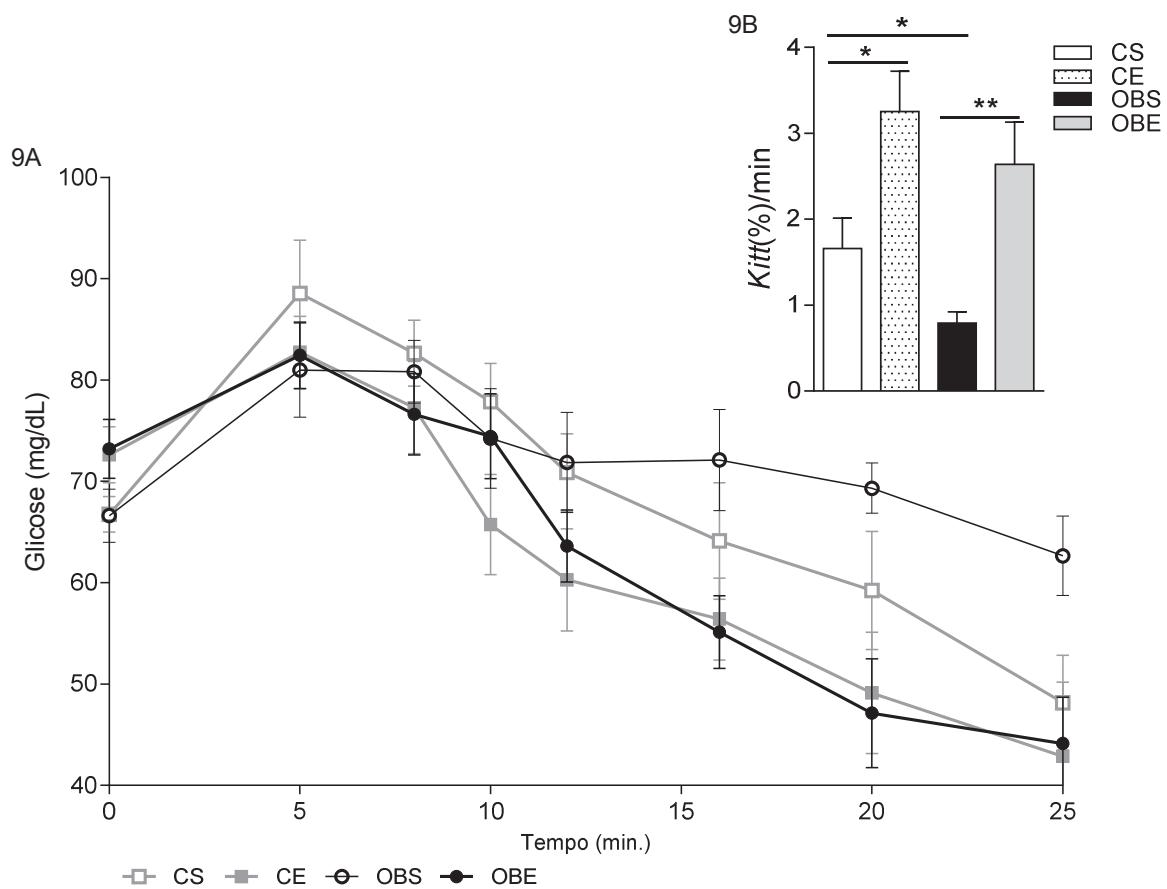
TABELA 2. CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, COLESTEROL TOTAL E TRIACILGLICEROL NO PLASMA DOS ANIMAIS DO GRUPOS CONTROLE SEDENTÁRIO (CS), EXERCITADO (CE), OBESO-INDUZIDO SEDENTÁRIO (OBS) E OBESO-INDUZIDO EXERCITADO (OBE). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  SEM (N = 8-10 RATOS POR GRUPO). \* $P < 0,05$  VS CS.

mg/dL	CS	CE	OBS	OBE
Glicose	76.69 $\pm$ 2.08	71.63 $\pm$ 2.03	77.05 $\pm$ 1.81	77.37 $\pm$ 2.51
Colesterol Total	94.52 $\pm$ 0.91	88.40 $\pm$ 1.5*	93.14 $\pm$ 0.87	89.80 $\pm$ 1.22
Triacilgliceróis	66,22 $\pm$ 2,53	63,10 $\pm$ 1,99	65,71 $\pm$ 2,98	63,89 $\pm$ 1,96

#### 4.3. TESTES DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Animais obesos-induzidos sedentários apresentaram resistência à insulina (52.3%) quando comparado ao controle sedentário ( $p < 0.05$ ). O exercício promoveu aumento da sensibilidade à insulina (FIGURA 9) em 95.7% nos animais controle exercitados (CS x CE,  $p < 0.05$ ). Nos animais obesos-induzidos exercitados (OBE) houve aumento altamente significativo da sensibilidade à insulina (233.7%) quando comparado ao grupo obeso-induzido sedentário ( $p < 0.01$ ).

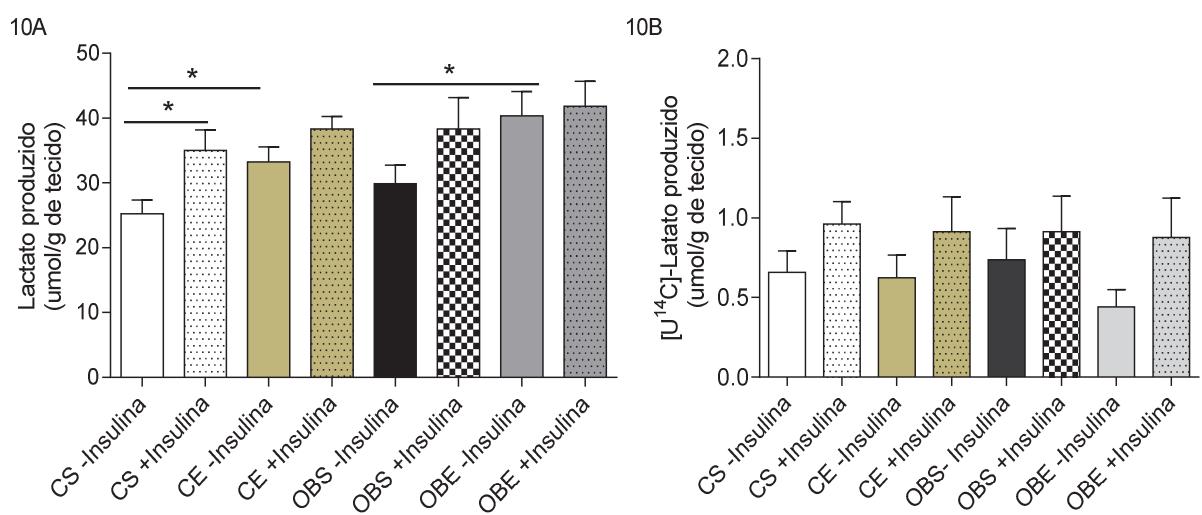
FIGURA 9 - TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (1,0 UI/KG) E TAXA DE DECAIMENTO DA GLICOSE (KITT) AOS 85 DIAS DE VIDA DOS ANIMAIS (9A E 9B, RESPECTIVAMENTE) DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE SEDENTÁRIOS (CS), EXERCITADOS (CE), OBESOS-INDUZIDOS SEDENTÁRIOS (OBS) E OBESOS-INDUZIDOS EXERCITADOS (OBE), OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM (8-10 RATOS POR GRUPO). \*P < 0,05 CE E OBS VS. CS; \*\*P < 0,01 OBE VS. OBS.



#### 4.4. DESCARBOXILAÇÃO DA GLICOSE PELO MÚSCULO SÓLEO E GORDURA PERIGONADAL

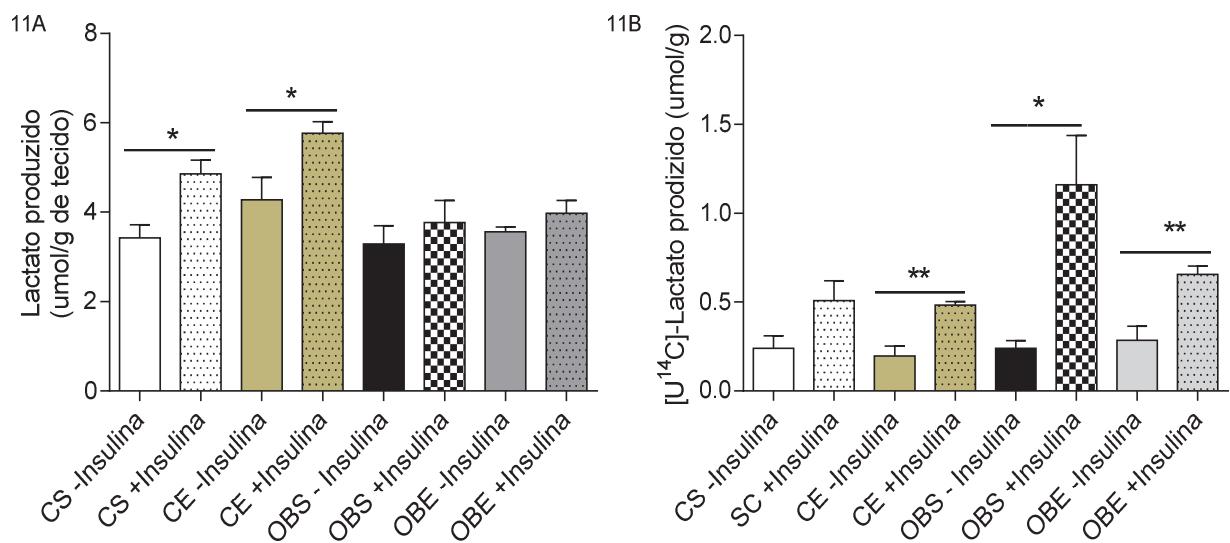
Na condição basal (ausência do estímulo insulínico) a produção total de lactato (FIGURA 10A) pelo músculo sóleo dos ratos exercitados foi significativamente maior (31,8%) em relação ao controle (CE x CS,  $p < 0,05$ ). Em ratos obesos-induzidos sedentários (OBS), a produção de lactato em condições basais não foi diferente do controle (OBS vs CS,  $p > 0,05$ ), mas os ratos obesos-induzidos exercitados (OBE) apresentaram aumento da produção de lactato de 35,0% em comparação com a dos não exercitados ( $p < 0,05$  OBE x OBS). Na presença da insulina o músculo sóleo de ratos de controle (CS), apresentou aumento na produção de lactato em 38,8%. Nos grupos exercitados (CE e OBE) não houve aumento adicional na produção de lactato em comparação com condição não estimulada ( $p > 0,05$ ). A produção de lactato radiomarcado (FIGURA 10B) a partir da glicose D- [ $^{14}\text{C}$ ] não foi diferente entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

FIGURA 10 - PRODUÇÃO DE LACTATO TOTAL (A) E RADIOMARCADO (B) PELO MÚSCULO SÓLEO INCUBADO EM TAMPÃO KREBS-RINGER CONTENDO GLICOSE 5,6 MM E GLICOSE D- [ $^{14}\text{C}$ ] 0,1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , DURANTE 1 HORA, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INSULINA (10 MUI)/ML. OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM (8-10 RATOS POR GRUPO).\*  $P < 0,05$ .



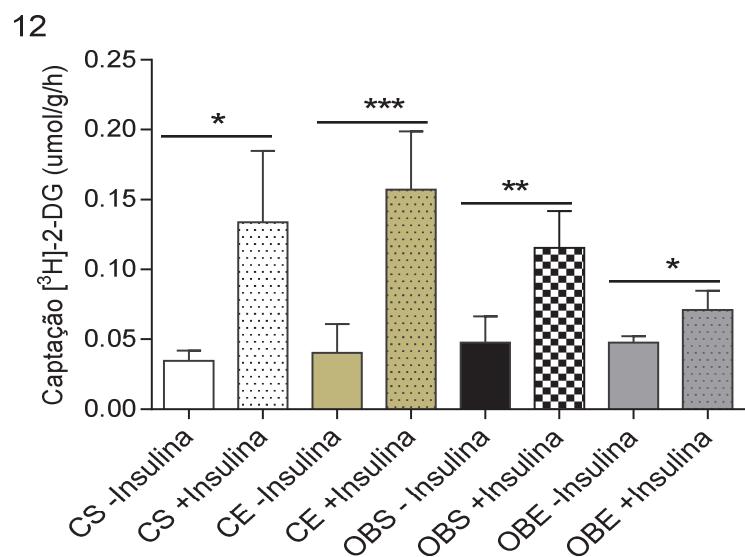
A produção lactato total pela gordura perigonadal em condição basal ou seja, sem estímulo, não foi diferente entre os grupos ( $p>0,05$ ). Na presença de insulina aumentou nos grupos controle sedentário (CS) e exercitado (CE) em 41,92% e 80,78%, respectivamente (Figura 11A) em comparação a ausência de insulina ( $p <0,05$ ). Nos grupos obesos-induzidos exercitados ou não, não houve diferença significativa na produção de lactato total entre os grupos ( $p>0,05$ ). A produção de lactato radiomarcado (Figura 11B) na ausência de estímulo não foi diferente entre os grupos. A adição de insulina provocou aumento na produção de lactato radiomarcado de 60% no grupo exercitado (CE,  $p <0,001$ ), no obeso-induzido sedentário de 79%, (OBS,  $p <0,05$ ) e no obeso-induzido exercitado de 56% (OBE, $p <0,05$ ) quando comparado a condição de ausência de insulina.

FIGURA 11 - PRODUÇÃO DE LACTATO TOTAL (A) E RADIOMARCADO (B)  
PELAGORDURA PERIGONADAL INCUBADA EM TAMPÃO KREBS-RINGER CONTENDO  
GLICOSE 5,6 MM E GLICOSE D-[U-14C] 0,1  $\mu$ Cl/mL, DURANTE 1 HORA, NA PRESENÇA E  
AUSÊNCIA DE INSULINA (10 mUI/mL). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  SEM (8-  
10 RATOS POR GRUPO).\*  $P<0,05$  , \*\* $P< 0,01$  VS. AUSÊNCIA DE INSULINA.



Em condições basais (sem insulina) não houve diferença entre os grupos quanto à captação de 2-DG. A adição de insulina ao meio de incubação elevou a captação de 2-DG em todos os grupos de maneira significativa ( $p<0,05$ ) sendo no grupo sedentário (CS) de 285% e obeso-induzido sedentário (OBS) de 145%. Nos grupo exercitado (CE) e obeso-induzido exercitado o aumento foi de 290% e 49%.

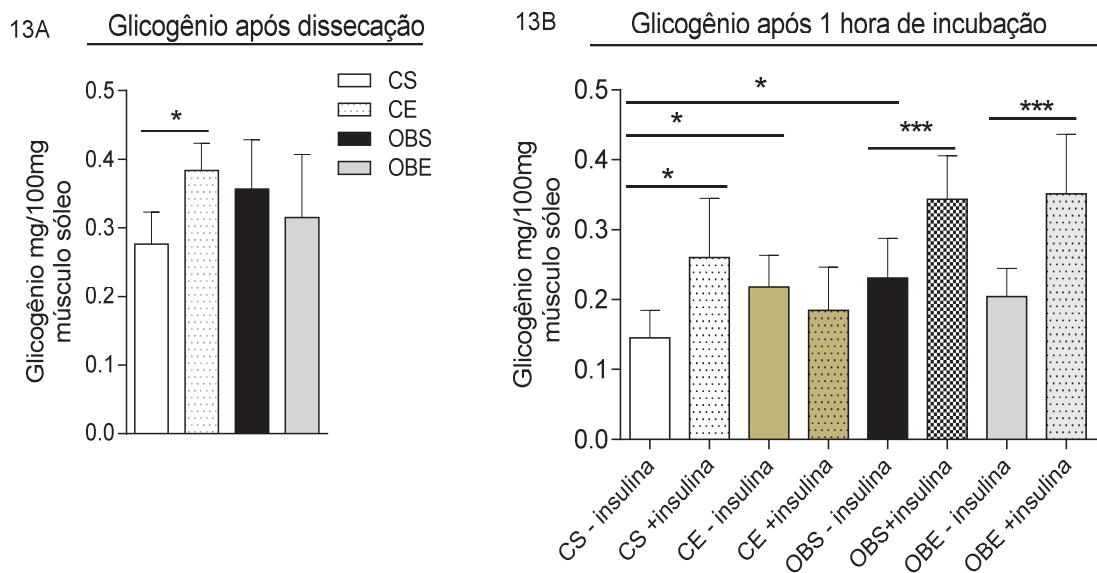
FIGURA 12 - CAPTAÇÃO DE 2 DESOXI [3H] GLICOSEPELO MÚSCULO SÓLEO ISOLADO INCUBADO EM TAMPÃO KREBS-RINGER CONTENDO GLICOSE 5,6 MM E 2 DESOXI [3H] GLICOSE(0,1  $\mu$ CI/ML), DURANTE 1 HORA, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INSULINA (10 MUI/ML).OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM (8-10 RATOS POR GRUPO.\*  
 $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  VS. AUSÊNCIA DE INSULINA.



#### 4.5. CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO NO TECIDO MUSCULAR E ADIPOSO

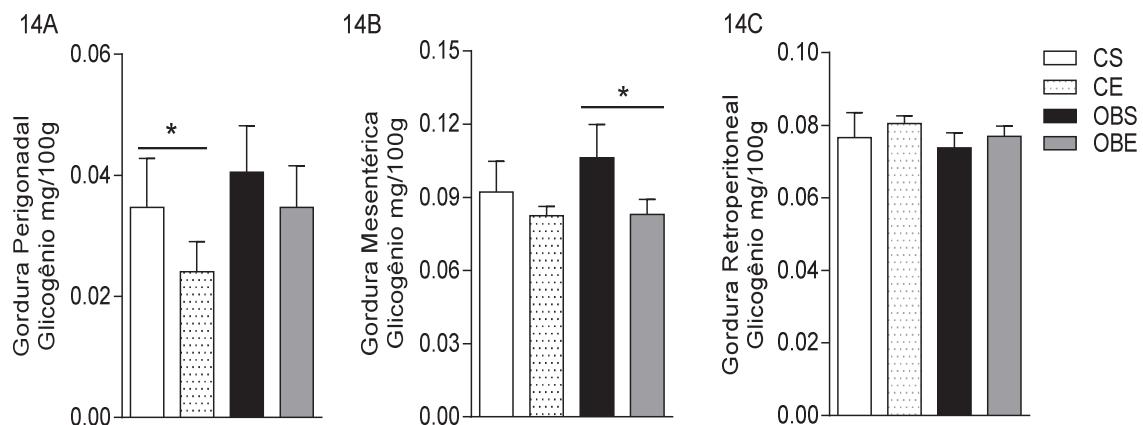
O conteúdo de glicogênio nos músculos sóleo logo após a dissecação está apresentado na FIGURA 13A. No grupo controle exercitado o conteúdo foi 38% maior que o do grupo sedentário (CE vs. CS,  $p<0,05$ ). Nos grupos obesos-induzidos exercitados ou não, o conteúdo estava ligeiramente maior que o do sedentário, contudo não foi estatisticamente diferente ( $p>0,05$ ). Após 1 hora de incubação, o conteúdo de glicogênio (FIGURA 13B) na ausência de insulina foi significativo apenas ao compararmos o grupo obeso-induzido e controle sedentário onde o conteúdo de glicogênio muscular foi 58% maior quando comparado ao do sedentário (OBS x CS,  $p< 0,05$ ). A adição de insulina promoveu aumento no conteúdo de glicogênio em todos os grupos, exceto no grupo controle exercitado (CE vs CE-insulina,  $p>0,05$ ). No grupo controle sedentário houve incremento de 78%, no controle exercitado aumento de 50%, no obeso-induzido sedentário aumento de 49% e no obeso-induzido exercitado elevação de 71%.

FIGURA 13 - CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO NO MÚSCULO SÓLEO APÓS A DISSECAÇÃO (A) E APÓS 1 HORA DE INCUBAÇÃO (B) EM TAMPÃO KREBS-RINGER CONTENDO GLICOSE 5,6 mM NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE INSULINA (10 MUI/ML) OS DADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM. (N = 8-9 RATOS POR GRUPO). \*  $P<0,05$ , \*\*\*  $P< 0,001$ .



O conteúdo de glicogênio dos depósitos de gordura após dissecção está apresentado na FIGURA 14. Na gordura perigonadal do grupo controle exercitado (FIGURA 14A) o conteúdo de glicogênio foi 30% menor do que o do controle sedentário ( $p<0,05$  CE vs CS). Nos animais do grupo obeso-induzido exercitados ou não, o conteúdo de glicogênio não foi diferente estatisticamente quando comparados entre eles ou ao grupo controle sedentário ( $p>0,05$ ). No tecido adiposo mesentérico foi encontrado elevação no conteúdo de glicogênio apenas no grupo obeso-induzido sedentário (22%) quando comparado ao grupo exercitado obeso-induzido ( $p<0,05$ ). No tecido adiposo retroperitoneal não houve diferença no conteúdo de glicogênio entre os grupos ( $p>0,05$ ).

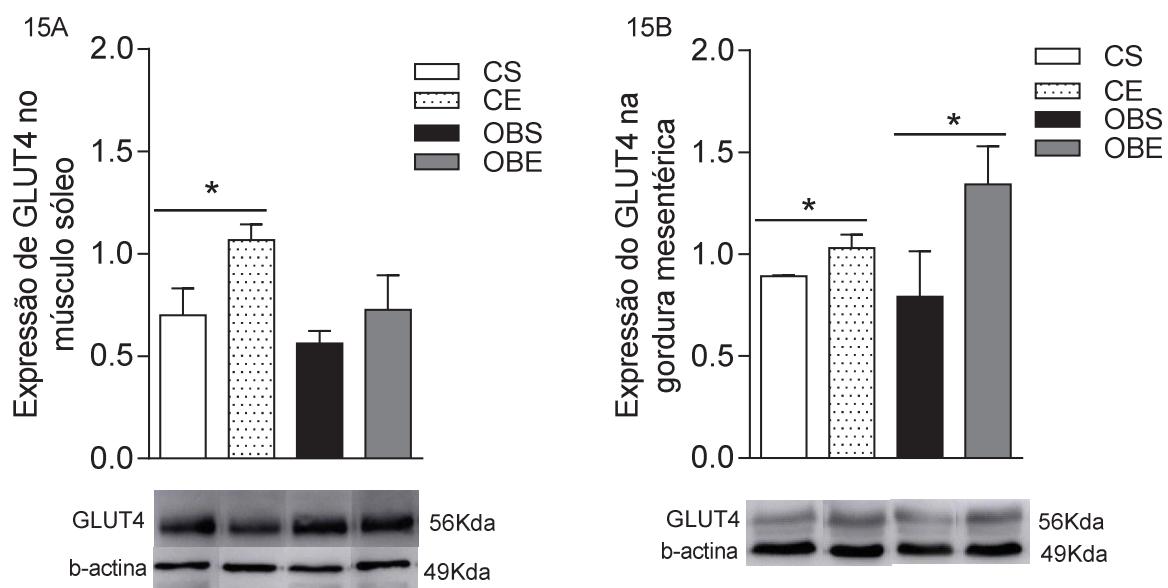
FIGURA 14 - CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO NO TECIDO ADIPOSO PERIGONADAL (A), MESENTÉRICO (B) E RETROPERITONEAL (C) APÓS A DISSECAÇÃO. OS DADOS ESTÃO APRESENTADOS COMO MÉDIA  $\pm$  EPM (N = 8-9 RATOS POR GRUPO). \* $P<0,05$ .



#### 4.6. EXPRESSÃO PROTEICA NO MÚSCULO SÓLEO E TECIDO ADIPOSO

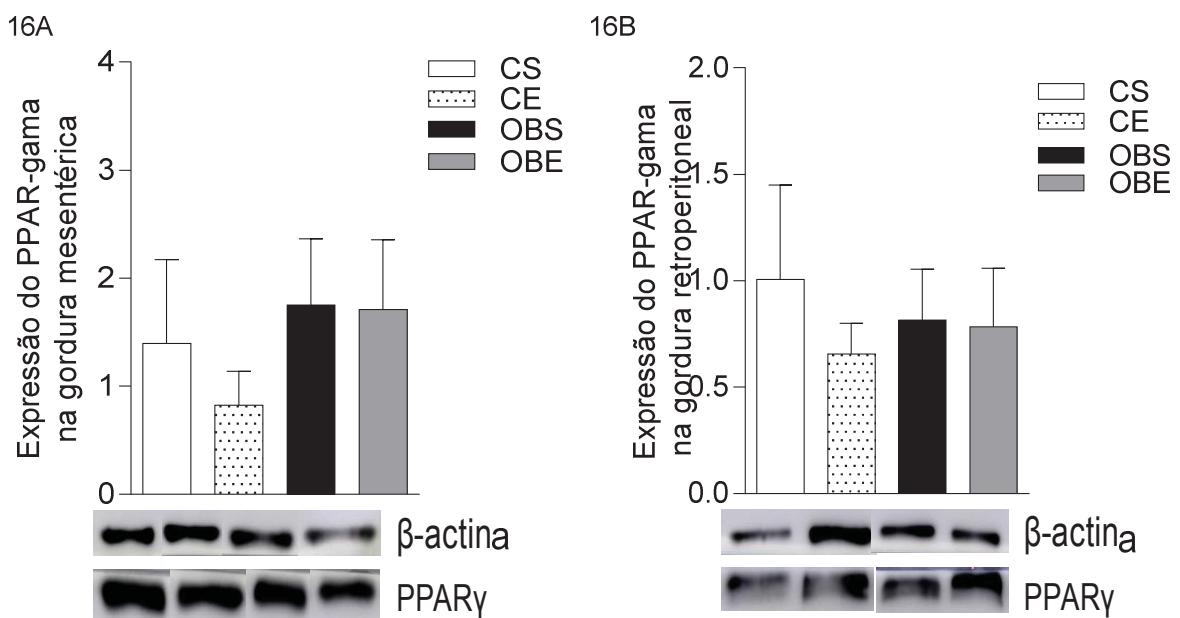
A expressão da proteína GLUT 4 no músculo sóleo aumentou nos animais controle exercitados (52%, p <0,05). No tecido adiposo mesentérico (15B) em ratos obesos exercitados (OBE) e controles exercitados (CE), o aumento da expressão GLUT4 da proteína foi de 69% e 15,5%, comparados aos grupos obeso sedentário (OBS) e controle sedentário (CS), respectivamente (p <0,05).

FIGURA 15 - EXPRESSÃO DE GLUT4 NO MÚSCULO SÓLEO (A) E TECIDO ADIPOSO MESENTÉRICO (B) OBTIDO DE RATOS SEDENTÁRIOS (CS), EXERCITADOS (CE), SEDENTÁRIOS OBESOS-INDUZIDOS (OBS) E EXERCITADOS OBESOS-INDUZIDOS (OBE). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± EPM (N = 4-6 RATOS POR GRUPO).\* P<0,05.



A expressão da proteína PPAR-gama (PPAR $\gamma$ ) nos tecidos adiposos mesentérico e retroperitoneal não foi diferente entre os grupos (Figura 16,  $p > 0,05$ ).

FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE PPAR $\gamma$  NO TECIDO ADIPOSO MESENTÉRICO (A) E RETROPERITONEAL (B) OBTIDO DE RATOS SEDENTÁRIOS (CS), EXERCITADOS (CE), SEDENTÁRIOS OBESOS-INDUZIDOS (OBS) E EXERCITADOS OBESOS-INDUZIDOS (OBE). OS DADOS ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA  $\pm$  SEM ( $N = 4-6$  RATOS POR GRUPO).\*  $P < 0,05$ .



#### 4.7. PERCENTUAL DE ÁCIDOS GRAXOS

A identificação e quantificação (%) dos ácidos graxos no plasma dos animais estão demonstradas na tabela 3. O exercício (CE) provocou redução significativa apenas do ácido graxo poliinsaturado linoléico (18:2 n-6) em 27% quando comparado ao grupo sedentário (CS). A indução de obesidade por redução de ninhada induziu a elevação de 46% do ácido araquidônico quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ , OBS vs. CS). Os demais ácidos graxos não tiveram alteração no seu percentual plasmático. A introdução do exercício (OBE) não modificou estes parâmetros sendo iguais aos do grupo não exercitado ( $p > 0,05$  OBE vs. OBS).

O exercício reduziu o percentual de ácido palmítico (16:0) em 43%, houve redução do ácido oleico em 54% e provocou elevação no percentual de ácido araquidônico em 70%, no fígado do grupo controle exercitado quando comparado ao

percentual do grupo sedentário controle ( $p<0,05$ , CE vs. CS). No fígado, a indução de obesidade por redução de ninhada promoveu redução no percentual de ácido palmítico em 44% e elevou o percentual de ácido graxo linoleico e araquidônico em 40 e 49%, respectivamente ( $p<0,05$  OBS vs CS). Nos animais obesos-induzidos exercitados (OBE) houve elevação do percentual de ácido araquidônico de 16,5%, o que foi significativo quando comparado ao grupo obeso-induzido sedentário ( $p<0,05$  OBE vs. OBS). Nos demais ácidos graxos não foi demonstrada diferença significativa ( $p>0,05$ ).

TABELA 3. Percentual de ácidos graxos (%) no plasma e no fígado dos animais do grupo controle sedentário (CS), exercitado (CE), obeso-induzido sedentário (OBS) e obeso-induzido exercitado (OBE). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n = 5$  ratos por grupo). $P <0,05$ ,  $^{\#}$ CE X CS,  $^{*}$ OBS X CS,  $^{&}$ OBE X OBS.

ÁCIDOS GRAXOS	PLASMÁTICO			
	CS	CE	OBS	OBE
<b>Mirístico (14:0)</b>	1,58 $\pm$ 0,47	0,84 $\pm$ 0,29	1,76 $\pm$ 0,28	2,26 $\pm$ 0,65
<b>Palmitíco (16:0)</b>	30,19 $\pm$ 1,52	29,92 $\pm$ 3,84	26,73 $\pm$ 1,32	28,27 $\pm$ 1,04
<b>Esteárico (18:0)</b>	12,57 $\pm$ 1,80	13,20 $\pm$ 1,44	12,64 $\pm$ 1,11	12,26 $\pm$ 1,77
<b>Oléico (18:1 n-9)</b>	11,07 $\pm$ 1,00	10,06 $\pm$ 0,95	10,47 $\pm$ 0,55	11,18 $\pm$ 0,65
<b>Linoléico (18:2 n-6)</b>	23,28 $\pm$ 1,49	16,84 $\pm$ 2,30 $^{\#}$	23,02 $\pm$ 2,11	24,62 $\pm$ 2,40
<b>Araquidônico (20:4 n-6)</b>	13,39 $\pm$ 0,78	13,15 $\pm$ 2,77	19,66 $\pm$ 1,53 $^{*}$	16,78 $\pm$ 0,52
<b>DHA (22:6 n-3)</b>	3,12 $\pm$ 0,29	3,72 $\pm$ 0,81	4,15 $\pm$ 0,62	4,84 $\pm$ 0,89

ÁCIDOS GRAXOS	FÍGADO			
	CS	CE	OBS	OBE
<b>Mirístico (14:0)</b>	8,21 $\pm$ 1,37	8,25 $\pm$ 0,92	7,27 $\pm$ 0,69	6,42 $\pm$ 0,62
<b>Palmitíco (16:0)</b>	23,59 $\pm$ 4,27	10,08 $\pm$ 1,60 $^{\#}$	10,47 $\pm$ 0,71 $^{*}$	10,04 $\pm$ 0,99
<b>Esteárico (18:0)</b>	10,31 $\pm$ 2,82	7,33 $\pm$ 1,66	5,60 $\pm$ 1,15	5,79 $\pm$ 0,45
<b>Oléico (18:1 n-9)</b>	10,16 $\pm$ 1,47	5,49 $\pm$ 1,59 $^{\#}$	8,30 $\pm$ 0,59	7,56 $\pm$ 0,43
<b>Linoléico (18:2 n-6)</b>	24,01 $\pm$ 1,69	29,03 $\pm$ 2,61	33,74 $\pm$ 2,44 $^{*}$	27,93 $\pm$ 0,82
<b>Araquidônico (20:4 n-6)</b>	24,31 $\pm$ 4,98	41,49 $\pm$ 2,99 $^{\#}$	36,25 $\pm$ 1,75 $^{*}$	42,25 $\pm$ 1,39 $^{&}$

A identificação e quantificação (%) dos ácidos graxos no tecido adiposo mesentérico, retroperitoneal e perigonadal dos animais está demonstrada na tabela 4. No tecido adiposo mesentérico houve modificação no percentual de ácido graxo linoléico (18:2 n-6) apenas no grupo obeso-induzido com aumento de 13% quando comparado ao grupo controle ( $p<0,05$  OBS vs. CS).

No tecido adiposo retroperitoneal o exercício (CE) causou aumento no percentual do ácido graxo esteárico (C18:0) inicialmente não detectável e do ácido graxo oléico em 15% e redução no percentual de ácido graxo poliinsaturado eicosapentaenóico (20:5 n-3) em 44%( $p<0,05$  CE vs. CS). Nos animais obesos-induzidos sedentários (OBS) foi encontrado redução apenas no percentual de ácido araquidônico em 55% ( $p<0,05$  OBS vs. CS). A introdução do exercício ao grupo obeso-induzido (OBE) não alterou estes percentuais ( $p>0,05$  OBE vs. OBS).

No tecido adiposo perigonadal o exercício (CE) causou redução apenas no percentual de ácido graxo araquidônico em 15% ( $p<0,05$  CE vs. CS). O mesmo foi encontrado no grupo obeso-induzido sedentário ( $p<0,05$  OBD vs. CS). A introdução de exercício ao grupo obeso (OBE) aumentou o percentual de ácido graxo oleico em 5% e 7% quando comparado aos grupos OBS e CE, respectivamente ( $p<0,05$ ).

TABELA 4. Percentual de ácidos graxos (%) no tecido adiposo mesentérico, retroperitoneal e perigonadal dos animais do grupo controle sedentário (CS), exercitado (CE), obeso-induzido sedentário (OBS) e obeso-induzido exercitado (OBE). Os dados estão apresentados como média ± SEM ( $n = 5$  ratos por grupo).  $p < 0,05$ , <sup>#</sup>CEX CS, <sup>\*</sup>OBS X CS, <sup>&</sup>OBEX OBS.

GORDURA MESENTÉRICA				
ÁCIDOS GRAXOS	CS	CE	OBS	OBE
Palmítico (16:0)	17,36 ± 1,63	16,94 ± 3,32	15,91 ± 2,65	15,17 ± 0,94
Esteárico (18:0)	2,376 ± 0,27	2,063 ± 0,79	2,000 ± 1,00	1,523 ± 0,44
Oléico (18:1 n-9)	27,90 ± 0,90	27,78 ± 1,26	27,93 ± 1,01	27,66 ± 0,78
Linoléico (18:2 n-6)	46,82 ± 1,48	48,00 ± 6,00	53,06 ± 2,07*	51,33 ± 2,13
Araquidônico (20:4 n-6)	3,397 ± 0,70	4,067 ± 0,06	2,285 ± 0,28	2,935 ± 0,82
GORDURA RETROPERITONEAL				
ÁCIDOS GRAXOS	CS	CE	OBS	OBE
Palmítico (16:0)	11,45 ± 1,09	14,51 ± 0,98	14,97 ± 1,20	12,71 ± 2,33
Esteárico (18:0)	---	1,903 ± 0,38	2,107 ± 0,70	2,173 ± 0,45
Oléico (18:1 n-9)	21,48 ± 1,49	24,73 ± 0,36 <sup>#</sup>	23,48 ± 0,86	27,40 ± 1,39
Linoléico (18:2 n-6)	57,20 ± 2,75	51,28 ± 0,64	51,16 ± 1,56	51,01 ± 1,71
Araquidônico (20:4 n-6)	6,858 ± 0,50	5,746 ± 0,44	3,823 ± 0,48*	4,067 ± 0,59
EPA (20:5 n-3)	5,218 ± 0,72	2,310 ± 0,64 <sup>#</sup>	2,700 ± 0,77	3,036 ± 0,57
DHA (22:6 n-3)	2,410 ± 0,41	0,9500 ± 0,42	1,757 ± 0,28	2,130 ± 0,62
GORDURA PERIGONADAL				
ÁCIDOS GRAXOS	CS	CE	OBS	OBE
Mirístico (14:0)	1,400 ± 0,24	1,000 ± 0	1,200 ± 0,20	1,25 ± 0,25
Palmítico (16:0)	18,80 ± 0,37	18,50 ± 1,04	18,40 ± 0,67	17,80 ± 0,73
Esteárico (18:0)	1,800 ± 0,20	2,250 ± 0,25	1,800 ± 0,20	1,750 ± 0,25
Oléico (18:1 n-9)	23,60 ± 0,24	23,50 ± 0,28	24,00 ± 0,31	25,20 ± 0,37 <sup>&amp;</sup>
Linoléico (18:2 n-6)	46,60 ± 0,50	47,00 ± 1,08	47,80 ± 0,73	47,40 ± 1,20
αLinoléico (18:3 n-3)	2,400 ± 0,40	3,000 ± 0,0	3,200 ± 0,20	2,600 ± 0,24
Araquidônico (20:4 n-6)	5,000 ± 0,01	4,250 ± 0,25 <sup>#</sup>	4,250 ± 0,25*	4,600 ± 0,67

## 5. DISCUSSÃO

Dentre os distúrbios metabólicos na obesidade destacam-se alterações no metabolismo glicolítico associadas ao ganho abundante de gordura visceral (GUTIERREZ; PUGLISI; HASTY, 2009). O eixo adipo-insulina vem sendo amplamente estudado, para compreensão da expansão do tecido adiposo, em especial visceral, e sua relação com alterações no metabolismo glicolítico dos tecidos periféricos (VICKERS et al., 2001). Em modelos animais de obesidade as mudanças no aporte energético durante a lactação induzem alterações no metabolismo, pré-dispondo a distúrbios metabólicos ao longo da vida, como a progressão do quadro de obesidade associado às alterações glicolíticas (PLAGEMANN A , HEIDRICH I, GÖTZ F, ROHDE W, 1992). No presente trabalho, o modelo utilizado mostrou-se efetivo em induzir obesidade nos animais ao atingir a idade adulta (90 dias), no entanto, assim como em outros trabalhos, neste estudo a obesidade não foi associada à hiperfagia (FIGURA 7)(COMOTTI, 2017; FISCHER et al., 2015; NERY; OS; MAS, 2009).

Neste modelo de obesidade a alteração nos padrões nutricionais do leite materno conduz modulações nos circuitos hipotalâmicos envolvidas na regulação da homeostase energética (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000), tendo como consequência desbalanço no metabolismo energético acarretando obesidade na prole (ABOUT et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a redução do número de filhotes por ninhada altera os padrões energéticos do leite materno e que este reflete sobre a modulação energética induzindo a obesidade nestes animais (CANCIAN et al., 2016;COMOTTI, 2016).

Observamos o aumento significativo da massa corpórea já durante a lactação acompanhada do aumento no IL aos 21 dias, tendo prevalência na massa corpórea novamente após 60 dias o qual persistiu até os 90 dias de vida. Em conjunto constatamos aumento de todos os depósitos de gordura visceral aos 90 dias e instalação do quadro de resistência à insulina (aos 85 dias de vida). A prevalência de gordura visceral associada à resistência à insulina em ratos que sofreram intervenções nutricionais na gestação ou lactação é demonstrada na literatura (BEI et al., 2015; FISCHER et al., 2015; LATOUCHE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2007; STANFORD; MIDDELBEEK; GOODYEAR, 2015). Além

das alterações nas massas dos depósitos de gordura também são relatadas outras alterações como o aumento da expressão de receptores para glicocorticoides, hiperplasia e hipertrofia de adipócitos, resistência à insulina na gordura visceral deste modelo (HABBOU et al., 2013).

Disfunções metabólicas como diabetes tipo 2, dislipidemia, obesidade e resistência à insulina estão associadas à inflamação crônica de baixo grau e a disfunções no metabolismo do tecido adiposo e muscular. A resistência à insulina é condição determinante para incapacidade dos tecidos insulino-dependentes alternar entre os substratos energéticos utilizados nos períodos de jejum e pós-prandial. A prática de exercício físico isolado ou associado a outros tratamentos tem sido indicada para melhora ou contenção destes distúrbios (HAWLEY; LESSARD, 2007; HOLLOSZY, 2005). Aqui inovamos ao introduzir a prática de exercício precocemente, iniciando aos 22 dias de vida. Em nosso estudo o exercício de natação crônica precoce minimizou o ganho de tecido adiposo visceral associado à maior sensibilidade à insulina nos animais obesos exercitados (Figuras 8 e 9).

A demanda energética durante o exercício aumenta a lipólise, diminui a taxa de reesterificação de ácidos graxos e aumenta a oxidação no músculo, resultando em perda de massa gorda (EGAN; ZIERATH, 2012; HOROWITZ, 2007). A melhora na sensibilidade à insulina pela redução de massa gorda parece estar relacionada à melhora do “imunometabolismo” no tecido adiposo em decorrência das modulações promovidas pelo exercício (VIEIRA-POTTER; ZIDON; PADILLA, 2015). A melhora do microambiente adiposo pelo exercício envolve a redução no diâmetro dos adipócitos, prevalência de adipocitocinas anti-inflamatórias secretadas e melhora do fenótipo de células infiltradas no tecido adiposo (GOH; GOH; ABBASI, 2016; HOROWITZ, 2007).

O exercício físico também promove alterações no tecido adiposo marrom (TAM), elevando a atividade metabólica e expansão (STANFORD; MIDDELBEEK; GOODYEAR, 2015). O aumento da atividade simpática, ativa receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos estimulando a biogênese mitocondrial, das proteínas UCPs e a oxidação de ácidos graxos neste tecido (SANCHEZ-DELGADO et al., 2015). A expansão do TAM parece estar relacionado à redução das concentrações de triacilgliceróis e colesterol plasmático (KHEDOE et al., 2015). Em nossos resultados associamos o potencial efeito do exercício físico sobre o crescimento do tecido

adiposo marrom como mecanismo auxiliar na contenção de ganho de massa adiposa visceral nos grupos exercitados. Pahlavani e colaboradores (2017) demonstraram que animais obesos tiveram conteúdo de massa adiposa visceral reduzido quando o tecido adiposo marrom apresentou crescimento (PAHLAVANI et al., 2017),

Não encontramos alterações nos padrões bioquímicos plasmáticos nos animais obesos aos 90 dias. Bei e colaboradores (2015) não encontraram alterações na glicemia com 120 dias neste modelo, mas com 21 dias (desmame) o perfil glicêmico encontrava-se alterado (BEI et al., 2015). Sugerimos que a normoglicemia pode estar relacionada à condição de hiperinsulinemia, assim como em indivíduos com diabetes tipo 2. Inicialmente tem-se estado compensatório onde células beta passam a hipersecretar insulina na tentativa de manter a normoglicemia, mecanismo que se torna falho à medida que os anos passam (BEI et al., 2015).

Na obesidade o metabolismo de carboidratos se encontra comprometido nos tecidos periféricos insulino-dependentes, especialmente no tecido muscular, responsável pelo maior percentual de captação de glicose plasmática (RODRIGUES et al., 2007). Em nosso trabalho avaliamos a sensibilidade à insulina *in vivo* por ITT, e *ex vivo* do tecido adiposo branco e muscular esquelético, o que possibilita observar a responsividade destes tecidos frente ao estímulo insulínico em ambiente isolado e sob as influências diversas do organismo. Corroborando a literatura, observamos resistência à insulina no teste de ITT (FIGURA 9) nos animais obesos, tendo o exercício físico efeito positivo sobre a sensibilidade à insulina nos grupos exercitados. Sabe-se que a resistência à insulina *in vivo* pode ser decorrente de ampla gama de fatores, como substâncias circulantes sistêmicas que venham a modular as vias de sinalização celular, como hormônios, adipocitocinas e lipídios (SHARMA et al., 2010).

Na abordagem *ex vivo*, a via glicolítica do músculo sóleo pode ser avaliada sem intervenções sistêmicas. Nossos resultados indicam que as alterações no metabolismo glicolítico não estão relacionadas à falha na captação da glicose neste tecido aos 90 dias, neste modelo experimental. Pois, interessantemente os animais obesos responderam de forma muito similar à do controle, quanto a produção de lactato em condições basais e, sob estímulo insulínico embora não significativa mas com resposta expressiva. A taxa de produção de lactato radiomarcado não

apresentou diferença entre os grupos experimentais. Estes dados corroboram o estudo de Ghezzi e colaboradores (2011) o qual demonstra que animais deste modelo alimentados com elevadas doses de frutose não apresentam falha na captação de glicose e síntese de glicogênio no músculo esquelético (GHEZZI et al., 2011). Mensuramos ainda a captação de 2DG pelo tecido muscular após a incubação, na ausência ou presença do estímulo insulínico (FIGURA 12), onde todos os grupos responderam de forma similar, demonstrando novamente que não há comprometimento evidente do tecido muscular aos 90 dias.

No tecido adiposo branco na avaliação *ex vivo*, a síntese de lactato a partir da glicose radiomarcada encontramos que animais obesos sedentários e exercitados não apresentam alteração na via glicolítica (FIGURA 11B). No entanto, observamos que há pouca responsividade frente ao estímulo insulínico e ao exercício crônico quando avaliada a produção de lactato total (sem marcação radiativa) nos animais obesos (FIGURA 11A). Desta forma os dados sugerem que neste período, as alterações glicolíticas neste tecido não estão relacionadas apenas à deficiência na captação da glicose nesta idade, visto que o tecido adiposo perigonadal se apresentou responsável em captar a glicose *ex vivo*. Diante dos resultados encontrados sugerimos que o TAB tem o metabolismo de carboidratos primariamente afetado neste modelo obeso, diferindo do tecido muscular que ainda se apresenta responsável aos 90 dias *ex vivo*. Com base na literatura, é sabido que animais obesos apresentam alterações nos padrões de citocinas produzidas, decorrente do aumento da massa adiposa, disfunção dos adipócitos hipertróficos e aumento de infiltrados de macrófagos no estroma adiposo. Por sua vez tais citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-6, afetam o metabolismo energético levando ao quadro de resistência à insulina (GUTIERREZ; PUGLISI; HASTY, 2009). Sendo o músculo o principal órgão periférico envolvido na captação de glicose e promoção da normoglicemia, sugerimos que nos animais obesos sedentários, *in vivo*, este tecido possa ter a funcionalidade na captação de glicose comprometida devido a influências de fatores oriundos da expansão do tecido adiposo branco, como alterações no padrão de adipocitocinas. O armazenamento do tecido adiposo branco, especialmente visceral, está associado a um estado metabólico pró-inflamatório de baixo grau (GUTIERREZ; PUGLISI; HASTY, 2009). Rodrigues et al. (RODRIGUES et al., 2007) observaram que os adipócitos de ratos criados em

ninhadas reduzidas são resistentes ao estímulo insulínico. Nossos resultados, por outro lado, demonstram que não há comprometimento do metabolismo glicolítico aos 90 dias neste modelo, diferindo da maioria dos estudos, nos quais se avaliam os efeitos do elevado aporte energético mais tarde. Nosso trabalho limita-se apenas à avaliação *in vitro* da gordura perigonadal, assim sugerimos que estudos sejam realizados com tecidos mesentérico e retroperitoneal, visto que estes foram os que mais apresentaram aumento em massa e sendo mais suscetíveis a lipólise.

A resistência à insulina é condição chave para a incapacidade dos tecidos insulino-dependentes em alternar entre uso preferencial da glicose no período pós-prandial (alimentado) e ácidos graxos durante o jejum. Diversas condições podem levar ao desenvolvimento da resistência à insulina, dentre estes dislipidemias e fatores pró-inflamatórios secretados pelo tecido adiposo obeso são condições que parecem determinantes. Os mecanismos pelos quais os ácidos graxos podem intervir no metabolismo são diversos, como acúmulo de derivados do metabolismo lipídico, modulação da transcrição gênica, disfunção mitocondrial entre outros (MARTINS et al., 2012). A resistência à insulina pode ser resultante da falha na translocação de GLUT4 ou a sua baixa expressão nos tecidos insulino-dependentes (HANLEY et al., 2010)(LIU et al., 2013a). Não observamos alterações na expressão do GLUT4 no músculo aos 90 dias nos animais obesos-induzidos, o que vem ao encontro dos nossos demais resultados, demonstrando a responsividade glicolítica do músculo esquelético. Novamente ressaltamos que as alterações metabólicas no músculo neste modelo ocorrem após 90 dias. No tecido adiposo não houve alteração quanto à expressão de GLUT4 nos animais obesos-induzidos, tendo o exercício efeito positivo em ambos os grupos exercitados (FIGURA 15B). Aos 120 dias Bei e colaboradores encontraram redução na expressão de GLUT4, IRS1 (substrato 1 do receptor de insulina) e AKt2 (proteína quinase B). Sugerimos que alterações como a redução expressiva de GLUT4 e proteínas da via de sinalização da insulina possam ocorrer mais tarde. A literatura demonstra que o exercício físico é capaz de restabelecer a normoglicemia em função das mudanças moleculares nos tecidos insulino-dependentes. Melhorando a sensibilidade a ação da insulina e promovendo o aumento da expressão de GLUT4 no tecido adiposo e muscular. Ainda há outro mecanismo, descrito como via independente da insulina (dependente da concentração de ATP e cálcio intracelular), que também é

estimulado durante a prática de exercício, auxiliando no aumento da internalização da glicose no tecido muscular (PEREIRA et al., 2017).

Os autores Ceperuelo-Mallafré e colaboradores (2015) demonstraram que em adipócitos obtidos de humanos obesos, há aumento da deposição de glicogênio, impactando a expressão de citocinas pró-inflamatórias nessas células. O acúmulo de glicogênio em macrófagos parece ser um dos responsáveis pela modulação na prevalência dos macrófagos tipo M1 (pró-inflamatórios) no tecido adiposo obeso, tendo como processo desencadeador a hipoxia, que ocorre em decorrência de condições hipertróficas no tecido adiposo. Neste modelo de obesidade já demonstramos em trabalho anterior que aos 90 dias o tecido adiposo visceral encontra-se com adipócitos hipertróficos (FISCHER et al., 2015). Em condições normais o glicogênio é encontrado em maiores concentrações no fígado e tecido muscular (JENSEN et al., 2011). No tecido muscular a capacidade de restabelecer as concentrações de glicogênio está associada à boa funcionalidade metabólica deste tecido. Em condições como resistência à insulina e DM2 esse encontra-se reduzido, tendo a insulina papel central na glicogênese (regulação da enzima glicogênio sintase)(HE; KELLEY, 2004; JENSEN et al., 2011). O aumento do conteúdo de glicogênio no tecido adiposo parece ter relação direta à redução da adiponectina (adipocitocina anti-inflamatória). Ao mensurarmos o conteúdo de glicogênio presente no tecido muscular logo após a dissecação (à fresco) e após 1 hora de incubação (FIGURA 13), e nos depósitos de gordura viscerais após dissecação, observamos que o músculo apresentava-se responsável em todos os grupos experimentais, reforçando nossos dados anteriores que demonstram a responsividade do tecido muscular aos 90 dias *ex vivo*. Nos depósitos de gordura dos grupos obesos não observamos alterações no conteúdo de glicogênio com exceção na redução em dois depósitos em função do exercício físico.

Diante da importância dos ácidos graxos no desenvolvimento da resistência à insulina, nós avaliamos o percentual de ácidos graxos nos depósitos de gordura, fígado e plasma para se investigar se há relação entre os ácidos graxos e as alterações metabólicas neste modelo obeso aos 90 dias. Estudos demonstraram a capacidade de fatores nutritivos de modular o metabolismo energético, em especial afetar de forma direta o desenvolvimento do tecido adiposo (ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005; LIU et al., 2013b).

A modulação do perfil inflamatório tecidual assim como desenvolvimento da síndrome metabólica está estreitamente relacionada ao perfil de ácidos graxos. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeias longas (W-6), como o ácido araquidônico (20:4 n-6) são indutores da resistência à insulina, pois são precursores de eicosanóides de perfil pró-inflamatório (MARTINS et al., 2012). Diversos são os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da resistência à insulina junto ao aumento de determinados ácidos graxos, como por exemplo a promoção da disfunção mitocondrial, modulação na transcrição gênica, stress oxidativo entre outros (MARTINS et al., 2012). No processo inicial de indução de pré-adipócitos alguns ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, como o araquidônico, se comportam como adipogênicos por atuar na regulação de genes do metabolismo lipídico (QUEIROZ; ALONSO-VALE; CURI, 2009). O aumento da razão de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI)  $\omega$ -6: $\omega$ -3 está associado a prevalência na produção de produtos bioativos, eicosanóides, da série pró-inflamatória que contribuem para síndrome metabólica, obesidade e diabetes (SIMOPOULOS, 2016). Nossos animais obesos apresentaram aumento no perfil de AGPI  $\omega$ -6 dos ácidos araquidônico (AA) e linoléico (18:2 n-6) plasmático e no fígado, com redução do ácido palmítico (C16:0) no fígado. O fígado é tido como principal local de metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados. Diversos estudos relacionam estado obeso em animais e humanos ao aumento de AA. O AA tem a maior concentração entre os componentes das membranas celulares, 25%, podendo ser adquirido pela dieta ou pela síntese no fígado a partir de seu precursor, o ácido linoléico. Os animais obesos demonstram claramente a relação do aumento do ácido linoléico em relação ao aumento do AA plasmático e no fígado. A prevalência na produção de AA está associada a patologias como resistência à insulina (SIMOPOULOS, 2016). Neste modelo de obesidade as alterações no perfil lipídico ocorrem de forma precoce, já aos 21 dias, e permanecem alteradas ao longo da vida destes animais, indicando desempenhar papel chave no desenvolvimento das alterações metabólicas (BEI et al., 2015),

Observamos neste estudo aumento do AA no fígado de ambos os grupos exercitados. Tanto no fígado como nos tecidos musculares (liso, cardíaco e esquelético) o AA tem capacidade de modular uma série de canais iônicos, em especial dos canais para  $\text{Ca}^{2+}$ , por mecanismos diretos (liga-se diretamente a receptores) ou ainda indiretos (metabólitos ou ativação proteínas quinases

específicas) (RYCHKOV et al., 2005). No músculo esquelético o AA é capaz de modular atividade de canais de  $\text{Na}^+$  ativos por tensão (BENDAHOU; CUMMINS; AGNEW, 1997). Além de estar relacionado a sinalização neuromuscular onde o AA junto com prostaglandinas atuam na dessensibilização do canal nicotínico (receptor ACh) na musculatura esquelética (NOJIMA; SASAKI; KIMURA, 2000). Sugerimos que o aumento do AA em ambos os grupos exercitados apresenta-se como adaptação ao exercício físico na tentativa de contribuir para melhora do desempenho, adaptando o tecido às condições de estímulos durante o exercício físico. O exercício físico foi capaz de promover a redução plasmática e ácidos linoléico (n6), e no fígado dos ácidos graxos oléico (n9) e palmítico (saturado) nos animais do grupo controle exercitado, o que não foi observado nos animais obesos-induzidos exercitados. Sugerimos diante destes dados pouca responsividade em modular perfil lipídico nestes animais, e mais estudos em relação a capacidade do exercício de modular o perfil lipídico dos diferentes depósitos de gordura neste modelo obeso são necessários.

Além de todos os efeitos sobre o metabolismo, o AA está relacionado ao estímulo da diferenciação de pré-adipócitos. Sugere-se na literatura que seu subproduto prostaglandina  $I_2$  via adenilato ciclase estimula o aumento do AMPc e consequentemente promove estimulação do PPAR $\gamma$ , que é essencial para a diferenciação dos pré-adipócitos (SIMOPOULOS, 2016). Nossos dados demonstraram a tendência no aumento da expressão do PPAR $\gamma$  nos tecidos adiposos visceral mesentérico e retroperitoneal nos animais obesos. O aumento da expressão de PPAR $\gamma$  é evidente em modelos animais durante lactação, associado à disponibilidade energética elevada, havendo platô pós-desmame, relacionando assim aumento de sua expressão ao período de intensa proliferação celular no tecido adiposo (LARSEN; TOUBRO; ASTRUP, 2003). Os PPARs são fatores de transcrição que controlam o desenvolvimento de células de gordura e sua capacidade de armazenar lipídios, além de estarem associados a sensibilidade à insulina neste tecido (MEDINA-GOMEZ; GRAY; VIDAL-PUIG, 2007). Assim a expressão do PPAR $\gamma$  varia ao longo desenvolvimento da obesidade, estando relacionado positivamente a disponibilidade energética, especialmente perfil lipídico (LARSEN; TOUBRO; ASTRUP, 2003). Aos 90 dias não conseguimos encontrar alteração estatística na expressão do PPAR $\gamma$ . Para tanto utilizamos anticorpo com

os duas isoformas (PPAR $\gamma$  1 e 2), sendo a isoforma 2 mais importante no tecido adiposo. Sugerimos que novas avaliações sejam realizadas com enfoque no subtipo 2 e adicionalmente sua avaliação no período logo pós-desmame, para compreender o papel deste sobre a adipogênese em relação ao maior aporte energético durante a lactação. PPAR $\gamma$  junto às proteínas C/EBPs são determinantes no processo tardio de diferenciação das células adiposas (QUEIROZ; ALONSO-VALE; CURI, 2009). Além de exercer papel sobre a adipogênese o PPAR $\gamma$  está atrelado à regulação de outros processos como o metabolismo lipídico e homeostase da glicose (KOUTNIKOVA et al., 2003)

Nossos dados até aqui demonstraram que a instalação da resistência à insulina e demais disfunções presentes neste modelo de obesidade aos 90 dias são decorrentes não apenas de mudanças intrínsecas do tecidos adiposo e muscular esquelético, mas da capacidade de responder a diversos fatores sistêmicos circulantes. Entendemos que o tecido adiposo neste período parece primariamente afetado, o que nos aponta novas perspectivas de estudo. Demonstramos que o exercício físico iniciado de forma precoce foi capaz de modular ambos os tecidos, de forma distinta, mantendo à sensibilidade a insulina e contendo o ganho de massa adiposa.

## 6. CONCLUSÃO

O modelo de obesidade utilizado mostrou-se válido para estudo das mudanças que ocorrem gradualmente nos tecidos periféricos insulino-dependentes nas condições como obesidade e resistência à insulina. Aos 90 dias a via glicolítica encontra-se funcional em ambos tecidos insulino-dependentes avaliados. O tecido adiposo apresenta respostas distintas em relação ao tecido muscular frente ao estímulo insulínico *ex vivo* e ao exercício físico. De modo geral, o exercício físico leve a moderado iniciado precocemente se mostrou ferramenta importante para contenção do ganho de massa adiposa e manutenção da sensibilidade à insulina até os 90 dias.

## REFERÊNCIAS

- ABBOUT, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 5, p. 553–562, 2013.
- ABUSHUFA, R. ; REED, P. ; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1707–1712, 1994.
- ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. **The Journal of Physiology**, v. 565, n. 1, p. 3–8, maio 2005.
- BAGCHI, D.; NAIR, S. **Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome**. 1. ed. San Diego: 2012, 2012.
- BEI, F. et al. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. **Lipids in Health and Disease**, p. 1–12, 2015.
- BENDAHOU, S.; CUMMINS, T. R.; AGNEW, W. S. Mechanism of modulation of the voltage-gated skeletal and cardiac muscle sodium channels by fatty acids. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 272, n. 2, p. C592–C600, fev. 1997.
- BERNARDIS, L.; PATTERSON, B. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527–528, 1968.
- BHADORIA, A. et al. Childhood obesity: Causes and consequences. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 4, n. 2, p. 187–192, 2015.
- BOGUSZEWSKI, C. L.; PAZ-FILHO, G.; VELLOSO, L. A. Neuroendocrine body weight regulation : integration between fat tissue , gastrointestinal tract , and the brain. **Endokrynologia Polska**, v. 61, n. 2, p. 194–206, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRITO, G. FLEXIBILIDADE METABÓLICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO ADIPOSO EM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDO POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO É MODIFICADA POSITIVAMENTE PELO EXERCÍCIO CRÔNICO. **Tese, Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná**, 2012.
- BRUCE, C. et al. Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 1, p. 99–107, 2006.
- CANCIAN, C. R. C. et al. Histological and metabolic state of dams suckling small litter or MSG-treated pups. **Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.
- CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **Journal of**

**Endocrinology**, v. 220, n. 2, p. 47–59, 8 jan. 2014.

CEPERUELO-MALLAFRÉ, V. et al. Adipose tissue glycogen accumulation is associated with obesity-linked inflammation in humans. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 1, p. 5–18, jan. 2016.

CHOE, S. S. et al. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. APR, p. 1–16, 2016.

COMOTTI, B. A. IMPLICAÇÕES DO MODELO DA PROGRAMAÇÃO METABÓLICA SOBRE A CITOARQUITETURA HIPOTALÂMICA E PARÂMETROS DE OBESIDADE. COMO A SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE PODE INFLUENCIAR NESTE CENÁRIO? **Tese, Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná**, 2017.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. **Neuroscience Letters**, v. 293, n. 1, p. 21–24, 2000.

DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; ROSS, M. G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. **International journal of obesity**, v. 39, n. 4, p. 633–641, 2015.

DHASARATHY, A.; ROEMMICH, J. N.; CLAYCOMBE, K. J. Influence of maternal obesity, diet and exercise on epigenetic regulation of adipocytes. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 54, n. 11, p. 37–49, abr. 2017.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Review Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, 2012.

ENGEL, P. C.; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD<sup>+</sup> in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, v. 88, n. 2, p. 475–484, 1978.

FISCHER, S. V. et al. Swimming training prevents metabolic imprinting induced by hypernutrition during lactation. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 10, n. 1, p. 13–20, fev. 2015.

FOLCH, J. .; LEES, M. .; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation 128 and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1957.

GC, K. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. **J Endocrinol**, v. 16, p. 9–17, 1957.

GHEZZI, A. C. et al. Impact of early fructose intake on metabolic profile and aerobic capacity of rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 3, 2011.

GIRALT, M.; VILLARROYA, F. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? **Endocrinology**, v. 154, n. 9, p. 2992–3000, set. 2013.

- GOH, J.; GOH, K. P.; ABBASI, A. Exercise and Adipose Tissue Macrophages: New Frontiers in Obesity Research? **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. June, p. 1–8, 2016.
- GOODPASTER, B. H.; SPARKS, L. M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 5, p. 1027–1036, maio 2017.
- GOOSSENS, G. H.; BLAAK, E. E. Adipose Tissue Dysfunction and Impaired Metabolic Health in Human Obesity: A Matter of Oxygen? **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. 55, p. 1–3, 24 abr. 2015.
- GUTIERREZ, D. A.; PUGLISI, M. J.; HASTY, A. H. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. **Current Diabetes Reports**, v. 9, n. 1, p. 26–32, 2009.
- HABBOUT, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 5, p. 553–562, 1 maio 2013.
- HANLEY, B. et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics – a review of present priorities and future opportunities. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 1, p. 1–25, 2010.
- HANSEN, D. et al. The effects of exercise training on fat-mass loss in obese patients during energy intake restriction. **Sports Med**, v. 37, n. 1, p. 31–46, 2007.
- HAWLEY, J. A.; LESSARD, S. J. Exercise training-induced improvements in insulin action. **Acta Physiologica**, v. 192, n. 1, p. 127–135, 29 out. 2007.
- HE, J.; KELLEY, D. E. Muscle glycogen content in type 2 diabetes mellitus. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 287, n. 5, p. E1002–E1007, 2004.
- HEGARTY, B. D. et al. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 178, n. 4, p. 373–383, ago. 2003.
- HOLLOSZY, J. O. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. **J Appl Physiol**, v. 99, p. 338–343, 2005.
- HOROWITZ, J. F. Exercise-Induced Alterations in Muscle Lipid Metabolism Improve Insulin Sensitivity. **Exercício Sport Sci Rev**, v. 4, n. 35, p. 192–196, 2007.
- HOUWARD, J. A. et al. Effect of Weight Loss on Insulin Sensitivity and Intramuscular Long-Chain Fatty Acyl-CoAs in Morbidly Obese Subjects. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2959–2963, 2002.
- HUE, L.; TAEGTMEYER, H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 3, p. E578–E591, 2009.
- JENSEN, J. et al. Muscle glycogen inharmoniously regulates glycogen synthase activity , glucose uptake , and proximal insulin signaling. **Am J Physiol Endocrinol**

**Metab**, p. 154–162, 2006.

JENSEN, J. et al. The Role of Skeletal Muscle Glycogen Breakdown for Regulation of Insulin Sensitivity by Exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2011.

JENSEN, J.; LAI, Y.-C. Regulation of muscle glycogen synthase phosphorylation and kinetic properties by insulin, exercise, adrenaline and role in insulin resistance. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 115, n. 1, p. 13–21, fev. 2009.

KELLEY, D. Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 7, p. 1699–1702, 2005.

KHEDOE, P. P. S. J. et al. Brown adipose tissue takes up plasma triglycerides mostly after lipolysis. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 1, p. 51–59, 2015.

KOUTNIKOVA, H. et al. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR hypomorphic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 24, p. 14457–14462, 25 nov. 2003.

LARSEN, T. M.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy? **International Journal of Obesity**, v. 27, n. 2, p. 147–161, fev. 2003.

LATOUCHE, C. et al. Maternal Overnutrition Programs Changes in the Expression of Skeletal Muscle Genes That Are Associated with Insulin Resistance and Defects of Oxidative Phosphorylation in Adult Male Rat Offspring. **Journal of Nutrition**, v. 144, n. 3, p. 237–244, 1 mar. 2014.

LE, B. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue : v. 21, n. 6, p. 697–738, 2000.

LEIGHTON, B. ; COOPER, G. J. S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature**, v. 335, p. 632-635, 1989.

LIU, H. W. et al. Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1859–1869, 2013a.

LIU, Z. et al. Neonatal overnutrition in mice exacerbates high-fat diet-induced metabolic perturbations. 2013b.

MANSUETO, G. et al. Transcription Factor EB Controls Metabolic Flexibility during Exercise. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 1, p. 182–196, 2017.

MARTINS, A. R. et al. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. **Lipids Health Disease**, v. 11, p. 1–11, 2012.

MEDINA-GOMEZ, G.; GRAY, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and PPAR $\gamma$ coactivator-1 (PGC1). **Public Health Nutrition**, v. 10, n. 10A, p. 1132–1137, 2007.

MITTENDORFER, B. Origins of metabolic complications in obesity: adipose tissue and free fatty acid trafficking. **Clinical Nutrition Metabolic Care**, v. 14, n. 6, p. 535–541, 2011.

MUOIO, D. M. Metabolic Inflexibility: When Mitochondrial Indecision Leads to Metabolic Gridlock. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1253–1262, dez. 2014.

NERY, S.; OS, T.; MAS, D. ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE FILHOTES NO ALEITAMENTO E NATAÇÃO NA ADOLESCÊNCIA: EFEITOS SOBRE MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS , GORDURA VISCEAL , GLICEMIA , ., p. 1–5, 2009.

NEWTON, S.; BRAITHWAITE, D.; AKINYEMIJI, T. Socio-economic status over the life course and obesity: Systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. 01–15, 2017.

NOJIMA, H.; SASAKI, T.; KIMURA, I. Arachidonic acid and prostaglandin D2 cooperatively accelerate desensitization of nicotinic acetylcholine receptor channel in mouse skeletal muscles. **Brain Research**, v. 852, n. 1, p. 233–238, jan. 2000.

OMS, O. M. DA S. **Childhood overweight and obesity**. Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/>>.

PAHLAVANI, M. et al. Eicosapentaenoic acid regulates brown adipose tissue metabolism in high-fat-fed mice and in clonal brown adipocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 39, p. 101–109, 2017.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic Programming in the Immediate Postnatal Life. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, n. 2, p. 18–28, 2011.

PEREIRA, R. M. et al. Molecular mechanisms of glucose uptake in skeletal muscle at rest and in response to exercise. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 23, n. spe, 2017.

PICÓ, C. et al. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: Different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. **Frontiers in Physiology**, v. 3 NOV, n. November, p. 1–14, 2012.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Research**, v. 836, n. 1–2, p. 146–155, 1999.

PLAGEMANN A , HEIDRICH I, GÖTZ F, ROHDE W, D. G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Exp Clin Endocrinol.**, v. 99, n. 3, p. 154–8, 1992.

QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M.; CURI, L. R. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 1, p. 582–594, 2009.

RODRIGUES, A. L. et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **Journal of Endocrinology**, v.

195, n. 3, p. 485–494, 2007.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. What We Talk About When We Talk About Fat. **Cell**, v. 156, n. 1–2, p. 20–44, jan. 2014.

RYCHKOV, G. Y. et al. Arachidonic acid inhibits the store-operated Ca 2+ current in rat liver cells. **Biochemical Journal**, v. 385, n. 2, p. 551–556, 15 jan. 2005.

SANCHEZ-DELGADO, G. . et al. Role of Exercise in the Activation of Brown Adipose Tissue. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 67, p. 21–32, 2015.

SHAIBI, G. Q. et al. Exercise for Obese Youth. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 43, n. 1, p. 41–47, jan. 2015.

SHARMA, N. et al. Insulin resistance for glucose uptake and Akt2 phosphorylation in the soleus, but not epitrochlearis, muscles of old vs. adult rats. **J Appl Physiol**, v. 6, n. 108, p. 1631–1640, 2010.

SIMOPOULOS, A. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 128, 2 mar. 2016.

SPARKS, L. M. et al. Relation of adipose tissue to metabolic flexibility. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 83, n. 1, p. 32–43, jan. 2009.

SPERETTA, G. F. F. et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 67, n. 12, p. 1469–77, 2012.

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

TCHKONIA, T. et al. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 644–656, maio 2013.

TOWBIN, H. .; GORDON., T. S. J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

TURCOTTE, L. P.; FISHER, J. S. Skeletal Muscle Insulin Resistance: Roles of Fatty Acid Metabolism and Exercise. **Physical Therapy**, v. 88, n. 11, p. 1279–1296, 1 nov. 2008.

UKROPCOVA, B. et al. Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 7, p. 1934–1941, 1 jul. 2005.

VENTURELLI, A. C. et al. Effects of exposure to Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) during lactation and puberty on sexual maturation and glycemic homeostasis in males rats. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 10, n. 1, p. 5–12, fev. 2015.

VICKERS, M. H. et al. Dysregulation of the adiponinsular axis – a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal

- programming. **Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 323–332, 2001.
- VICKERS, M. H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. **Nutrients**, v. 6, n. 6, p. 2165–2178, 2014.
- VIEIRA-POTTER, V. J.; ZIDON, T. M.; PADILLA, J. Exercise and Estrogen Make Fat Cells “Fit”. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 43, n. 3, p. 172–178, jul. 2015.
- VILLANUEVA-ORTEGA, E.; GARCÉS-HERNÁNDEZ, M. J.; GARIBAY NIETO, G. N. Pre- and post-natal nutritional factors in the metabolic regulation of obesity. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 80, n. 2, p. 111–118, abr. 2017.
- WALLBERG-HENRIKSSON, H. Glucose transport into skeletal muscle: influence of contractile activity, insulin, catecholamines and diabetes mellitus. **Scandinavian Physiological Society by Blackwell Scientific Publications**, v. 564, p. 1–80, 1987.
- WIDDOWSON, E. M.; MCCANCE, R. A. Some Effects of Accelerating Growth . I . General Somatic Development. 1960.
- WRONSKA, A.; KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 205, n. 2, p. 194–208, 2012.

## ANEXO I. COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 865

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.048030/2014-32

**APROVADO/APPROVAL:** 10/03/2015 – R.O. 02/2015

**TÍTULO:** Efeitos do exercício físico precoce sobre a flexibilidade metabólica em animais obesos por programação metabólica

**TITLE:** Effects of precocious exercise on metabolic flexibility in obese animals by metabolic programming

**AUTORES/AUTHORS:** Luiz Cláudio Fernandes, Stefani Valeria Fischer, Márcia Helena Appel, Kátia Naliwaiko, Dagliane Pagliosa Daneluz

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Fisiologia

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio  
 Coordenador da CEUA