

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar-UNESP

CYNTHIA APARECIDA DE CASTRO

**EFEITO DE TRÊS DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO,
RESISTIDO, AERÓBICO E COMBINADO, NA MODULAÇÃO DA
OMENTINA E VASPINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

São Carlos
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar-UNESP

CYNTHIA APARECIDA DE CASTRO

**EFEITO DE TRÊS DIFERENTES PROTOCOLOS DE TREINAMENTO,
RESISTIDO, AERÓBICO E COMBINADO, NA MODULAÇÃO DA
OMENTINA E VASPINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas associação ampla UFSCAR/UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte

Co-orientadores: Prof. Dr. Iran Malavazi

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Aníbal

São Carlos

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C355e Castro, Cynthia Aparecida de
Efeito de três diferentes protocolos de
treinamento, resistido, aeróbico e combinado, na
modulação da omentina e vaspina em modelo
experimental de diabetes mellitus tipo 2 / Cynthia
Aparecida de Castro. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
87 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Omentina. 2. Vaspina. 3. Diabetes. 4.
Inflamação. 5. Exercício físico. I. Título.

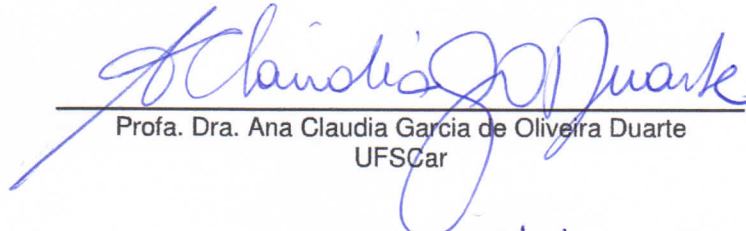


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

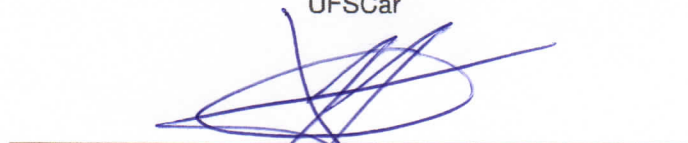
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Cynthia Aparecida de Castro, realizada em 08/08/2016:



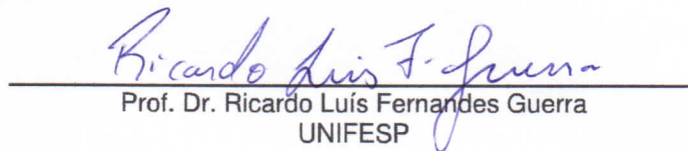
Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte
UFSCar



Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar



Prof. Dr. Cleiton Augusto Libardi
UFSCar



Prof. Dr. Ricardo Luis Fernandes Guerra
UNIFESP



Prof. Dr. Fernando Fabrizzi
UNICEP

DEDICATÓRIA

Dedicar essa Tese a uma só pessoa seria tarefa impossível ...

Decido a meus pais Lizetinha e Zezé de Castro.

Meus lindos anjos Lucas, Clarice, Bernardo e Lorenzo, onde encontro amor sincero e paz plena.

Aos meus irmãos Marcio e Carlos.

As minhas cunhadas Lidiane e Juliana.

A minha avó Marietinha e Tio Naldinho.....

Aos meus familiares e amigos pelo apoio, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela vida e oportunidade de evoluir como ser humano, aprendendo a perdoar e acreditar que tudo tem um propósito e faz parte de nosso crescimento espiritual.

Um agradecimento especial a Karina, não só pela parceria em todo o desenvolvimento do trabalho, mas principalmente pela amizade sincera.

A Professora Orientadora Ana Cláudia pela oportunidade, orientação e acolhimento em sua vida: “se algum dia eu fui pobre, não me alembro”...

Aos Co-orientadores Prof. Fernanda de Freitas Aníbal e Prof. Iran Malavazi, pelo apoio científico, ético e moral.

As colaboradoras, Marcela e Fernanda pelas conversas, risadas, cafés científicos muito produtivos.

A todos os meus amigos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados ao Exercício, Toninho, Isabel Cristina, Anderson, João Guilherme, Jorge, Caio, Bruno, Júlio, Ronam, Wilson, Leandro, Felipe. Em especial ao nosso querido técnico José Alves pela ajuda nos experimentos e risadas garantidas com o “bambú”.

A todos os amigos do Departamento de Educação Física, onde tive experiências acadêmicas muito importantes, Dagner, Thais, Alessandro e todos os professores, obrigada pelo carinho e convívio agradável.

Ao grupo do Laboratório de Parasitologia, Elisandra, Joice, Karina, Mauricio, Debora, pela maravilhosa convivência durante estes anos.

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada: Kríssia, João, Vitor em especial a Marina pela amizade e confiança. A todos que fizeram meus dias de intermináveis “western blot” mais divertidos.

Ao grupo do laboratório de Anatomia, Professores: Maíra, Salete, Luiz e Marcelo, pela oportunidade de lecionar e aprender mais.

Aos grandes amigos do laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica comparada onde, Rafael (Z), Mayris, Pedro (Zizi), Raquel.

Aos amigos que fiz em São Carlos, Grazielle, Maria Fernanda, Camila, Luísa, Cris, Naty, Luciana, Vinicius, Rafa, Ivana, Patrícia, Kido, Tatmatsu, Bruna.

Aos órgãos financiadores, Capes e FAPESP.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, ao nosso excelente secretário Alexandre.

Enfim, a todos que me ajudaram a superar a esta etapa.

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo verificar os efeitos de três diferentes modalidades de exercício (aeróbico, força e combinado) sobre a produção de adipocinas Omentina e Vaspina em ratos obesos com *diabetes mellitus* tipo 2. Para tal, ratos machos da linhagem *Wistar* receberam dieta rica em gordura durante 4 semanas e uma dose baixa de estreptozotocina (35 mg / kg) para induzir diabetes experimental. Após a indução, ocorreu a eutanásia de 5 ratos não-diabéticos e 5 diabéticos. O restante foi dividido em 8 grupos experimentais (n = 10): sedentário não-diabético (SN); treinamento resistido não-diabético (TRN); treinamento aeróbico não-diabético (TAN); treinamento combinado não-diabético (TCN); sedentário diabético (SD); treinamento resistido diabético (TRD); treinamento aeróbico diabético (TAD); treinamento combinado diabético (TCD). Os grupos foram submetidos ao exercício por 12 semanas, 3x/semana. O treino resistido foi realizado em escada com protocolo até a exaustão; o treinamento aeróbico em esteira, 30 min/dia atingindo 20m/min; O treinamento combinado consistiu na realização dos dois protocolos com intervalo mínimo de 6 horas entre as sessões. A massa corporal e a ingestão alimentar foram mensuradas diariamente. Ao término do período experimental ocorreu a eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado e os tecidos: fígado, tecido adiposo branco epididimal (EPI), retroperitoneal (RET) e visceral (VIS); músculo gastrocnêmio (GAST), braquiorradial e pâncreas foram removidos e imediatamente pesados. As concentrações séricas das citocinas TNF- α , IL-6, PCR, CXCL8, IL-10, IL-4 e adipocinas omentina, vaspina e adiponectina, foram determinadas pelo método ELISA e a expressão proteica de omentina e vaspina por Western blotting. Os resultados estão expressos em média e erro padrão, as comparações estatísticas foram feitas através de análise de variância, sendo considerado significativo $p < 0,05$. Nossos resultados demonstraram que o protocolo de dieta hiperlipídica com baixa dose de estreptozotocina foi eficaz em induzir o *diabetes mellitus* tipo 2 experimental. Nos grupos eutróficos os protocolos não alteraram a glicemia, mas melhoraram o perfil lipídico, onde o TRN reduziu os níveis de triglicérido, TAN reduziu colesterol total, TCN aumentou o HDL-c. As adipocinas omentina e vaspina não foram alteradas pelos protocolos apresentados, mas os marcadores inflamatórios IL-6 e PCR foram reduzidos pelo TAN. O grupo TCN aumentou CXCL8, mas reduziu significativamente a IL-6 e PCR. Já nos animais diabéticos, o grupo TRD melhorou o perfil lipídico dos ratos diabéticos. O grupo TAD reduziu os depósitos de gordura abdominal RET e VIS, evitou o aumento da glicemia, diminuiu a IL-6 e PRC, aumentou adiponectina circulante e aumentou a

omentina no tecido adiposo visceral. Já o grupo TCD aumentou os marcadores inflamatórios e reduziu a vaspina no músculo, não alterando a omentina no tecido adiposo. Além disso, a omentina apresentou correlação positiva forte com a adiponectina e correlação negativa moderada com a IL-6. Assim, concluímos que o treino aeróbico em animais diabéticos foi eficaz em promover melhoras na glicemia, aumentando a concentração de omentina, confirmando que esta tem relação com o perfil inflamatório em ratos diabéticos.

Palavras-chave: Omentina, vaspina, diabetes, inflamação, exercício físico.

ABSTRACT

This study aims to determine the effects of three different exercise modalities (aerobic, strength and combined) on the production of the adipokines Omentin and Vaspin in obese mice with type 2 diabetes mellitus. To this end, male Wistar rats received a fat rich diet for 4 weeks and a low dose of streptozotocin (35 mg / kg) in order to induce experimental diabetes. After induction, 5 non-diabetic and 5 diabetic mice were euthanized. The remaining animals were divided into eight experimental groups (n = 10): sedentary non-diabetic (SN); resistance training non-diabetic (TRN); non-diabetic aerobic training (TAN); combined training non-diabetic (TCN); sedentary diabetic (SD); resistance training diabetic (TRD); diabetic aerobic training (TAD); combined diabetic training (TCD). These groups were submitted to exercise for 12 weeks, 3 times per week. The resistance training was held at staircase with protocol until exhaustion; the aerobic training consisted in treadmill protocols of 30 min/ day reaching 20m/min; the combined training consisted in two protocols with a minimum interval of 6 hours between sessions. Body weight and food intake were measured daily. At the end of the trial period animals were euthanized by decapitation. Blood was collected as well as tissues samples of liver, epididymal white adipose tissue (EPI), retroperitoneal (RET) and visceral (VIS). In addition, gastrocnemius muscle (GAST), brachioradialis and pancreas were removed and immediately weighed. Serum concentrations of TNF- α cytokines, IL-6, PCR, CXCL8, IL-10, IL-4 and adipokines omentin, vaspin and adiponectin were determined by ELISA; and protein expression of omentin and vaspin were done by Western blotting analysis. Results are expressed as mean and standard error, statistical comparisons were made by variance analysis, with $p < 0.05$ being considered significant. Our results showed that the high fat diet protocol of streptozotocin with low dose was effective in inducing experimental diabetes mellitus type 2. In eutrophic groups the protocols did not change the blood glucose, but improved the lipid profile, where TRN reduced triglyceride, total cholesterol reduced TAN, TCN increased HDL-C omentin and vaspin. There are no changes in the studied adipokines by the available protocols, although inflammatory markers as IL-6 and CRP were reduced by TAN. CXCL8 values increased in the TCN group, but IL-6 and CRP values were significantly reduced. Diabetic animals, specifically TRD group had improved the lipid profile of diabetic rats. TAD group showed reduced abdominal fat deposits and RET VIS prevented the increase in blood glucose, decreased IL-6 and CRP increased circulating adiponectin and increased omentin in visceral adipose tissue. As for the TCD group it showed

increased inflammatory markers and reduced vaspin values in muscle, but there were no changes in the omentin in adipose tissue. Furthermore, omentin showed a strong positive correlation with the adiponectin and moderate negative correlation with IL-6. Thus, we conclude that diabetes induction protocol was effective. In developing the experimental type 2 diabetes; resistance, aerobic and combined training did not change omentin and vaspin values in non-diabetic rats, but improved the lipid profile and inflammation. In diabetic animals aerobic workout was effective in promoting improvement in glycemia, increasing the concentration of omentin, and decreasing inflammation, confirming that this is related to the inflammatory profile in diabetic rats.

Keywords: Omentin, vaspin, diabetes, inflammation, exercise.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CK	Creatinaquinase
CT	Colesterol total
CXCL8	(<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 8</i>) Interleucina-8
DM	Diabetes mellitus
ELISA	(<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) Ensaio de imunoabsorção enzimática
EP	Erro padrão da media
EPI	Tecido adiposo branco visceral epididimal
FIG	Fígado
g	Grama
GAST	Gastrocnêmio
HDL-c	(<i>High Density Lipoprotein</i>) Lipoproteína de alta densidade
HOMA	(<i>Homeostasis Model Assessment</i>) Modelo de avaliação da Homeostase
ITT	(<i>Tolerance test insulin</i>) Teste de tolerância a insulina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
Kcal	Quilocalorias
Kcal/g	Quilocalorias por grama
kDa	Quilodaltons
LDH	Lactato desidrogenase
LDL-c	(<i>Low Density Lipoprotein</i>) Lipoproteína de baixa densidade
M	Marcador de peso molecular
mg/dl	Miligrama por decilitro
ml	Mililitro
MUSC	Musculo
ng/ml	Nanograma por mililitro
OLETF	<i>Otsuka Long Evans Tokushima Fatty</i>
OMS	Organização Mundial de saúde
PCR	Proteína C Reativa
pg/ml	Picograma por mililitro
RET	Tecido adiposo branco visceral retroperitoneal
SD	Sedentário diabético
SN	Sedentário não-diabético
STZ	Estreptozotocina
TA	Temperatura ambiente
TAD	Treinamento aeróbico diabético
TAM	Tecido adiposo Marrom
TAN	Treinamento aeróbico não-diabético
TCD	Treinamento combinado diabético
TCN	Treinamento combinado não-diabético
TG	Triglicerídeos
TNF- α	(<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>) Fator de Necrose Tumoral-alfa
TRD	Treinamento resistido diabético
TRN	Treinamento resistido não-diabético
VIS	Tecido adiposo branco visceral omenta

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Tecido adiposo como órgão endócrino	17
FIGURA 2- Adipocinas induzidas pelo treinamento físico têm um efeito endócrino e melhora o metabolismo em vários tecidos.....	19
FIGURA 3- Desenho experimental	23
FIGURA 4 - Evolução ponderal e consumo alimentar.....	31
FIGURA 5 - Teste de tolerância a insulina (TTI).	33
FIGURA 6 - Citocinas no soro.	34
FIGURA 7-Concentração sérica de vaspina, omentina e adiponectina.....	35
FIGURA 8-Foto micrografias do pâncreas.	36
Figura 9 - Comportamento da glicemia e insulina.	44
FIGURA 10- Comportamento da enzimas Creatina quinase (CK), Lactato desidrogenase (LDH).	45
FIGURA 11 - Concentração de citocinas pró inflamatórias no soro.....	47
FIGURA 12- Concentração de citocinas anti-inflamatórias e adiponectina no soro,	48
FIGURA 13 -Concentração de Omentina no soro (A) e Tecido adiposo visceral (B).....	49
FIGURA 14 - Expressão proteica da Vaspina.	50
FIGURA 15- Comportamento da glicemia no início e no final do treinamento.	60
FIGURA 16-Teste de tolerância à insulina (ITT), Insulina, índice HOMA (<i>homeostatic model assessment</i>), função da célula beta (HOMA- β).	61
FIGURA 17 - Comportamento da enzimas Creatina quinase (CK), Lactato desidrogenase (LDH).	62
FIGURA 18 - Concentração de citocinas pró inflamatórias no soro.....	64
FIGURA 19 - Concentração de citocinas anti-inflamatórias e adiponectina no soro.	65
FIGURA 20 - Expressão proteica da Omentina.	66
FIGURA 21-Expressão proteica da Vaspina.	67
FIGURA 22-Correlação entre Omentina no Tecido Adiposo Visceral com IL-6 e Adiponectina sistêmicas.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Composição das dietas	24
Tabela 02: Parâmetros metabólicos dos grupos experimentais	32
Tabela 03: Peso relativo dos tecidos fígado, pâncreas, e depósitos de gordura abdominal (g/100g peso corporal)	32
Tabela 04: Ganho de massa corporal e ingesta alimentar e calórica	41
Tabela 05: Variáveis do treinamento. Carga máxima e Velocidade máxima atingida.....	42
Tabela 06: Colesterol total. Triglicerídeos e HDL colesterol (mg/dl).....	42
Tabela 07. Peso relativo dos tecidos Pâncreas. Fígado. e depósitos de gordura abdominal (g/100g peso corporal);.....	43
Tabela 08. Glicogênio muscular e hepático.....	45
Tabela 09: Ganho de massa corporal e ingesta alimentar e calórica.	57
Tabela 10: Variáveis do treinamento, Carga máxima e Velocidade máxima atingida.....	58
Tabela 11: Colesterol total, Triglicerídeos e HDL colesterol (mg/dl).....	58
Tabela 12. Peso relativo dos tecidos EPI, RET, VIS, Pâncreas e Fígado (g/100g peso corporal);	59
Tabela 13. Glicogênio muscular e hepático.....	63

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL:	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 ANIMAIS	22
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	22
3.3 DIETA	23
3.4 INDUÇÃO DO DIABETES TIPO 2	24
3.5 CONTROLE DA MASSA CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR.....	24
3.6 ACOMPANHAMENTO DO DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 2	25
3.7 PROTOCOLOS DE TREINAMENTO.....	25
3.8 EXPERIMENTOS E COLETA DE AMOSTRAS	27
3.9 PERFIL LIPÍDICO.....	27
3.10 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH) E CREATINA QUINASE (CK)	27
3.11 ANÁLISE DE GLICOGÊNIO MUSCULAR E HEPÁTICO	27
3.12 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE CITOCINAS E ADIPOCINAS.....	28
3.13 WESTERN BLOTTING	29
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 CAPÍTULO 1: INDUÇÃO DO DIABETES.....	31
4.2 CAPÍTULO 2: OS TRÊS PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO EM RATOS NÃO-DIABÉTICOS	41
4.3 CAPÍTULO 3: OS TRÊS PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO EM RATOS DIABÉTICOS	57
5. CONCLUSÃO.....	75
6. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

As doenças endócrino-metabólicas têm ganhado cada vez mais importância nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, tendo em vista que, nas últimas décadas, elas atingiram níveis epidemiológicos com elevadas taxas de mortalidade no mundo. Dessa forma suas etiologias, prevenções e tratamentos tornaram-se uma questão de interesse mundial da comunidade científica.

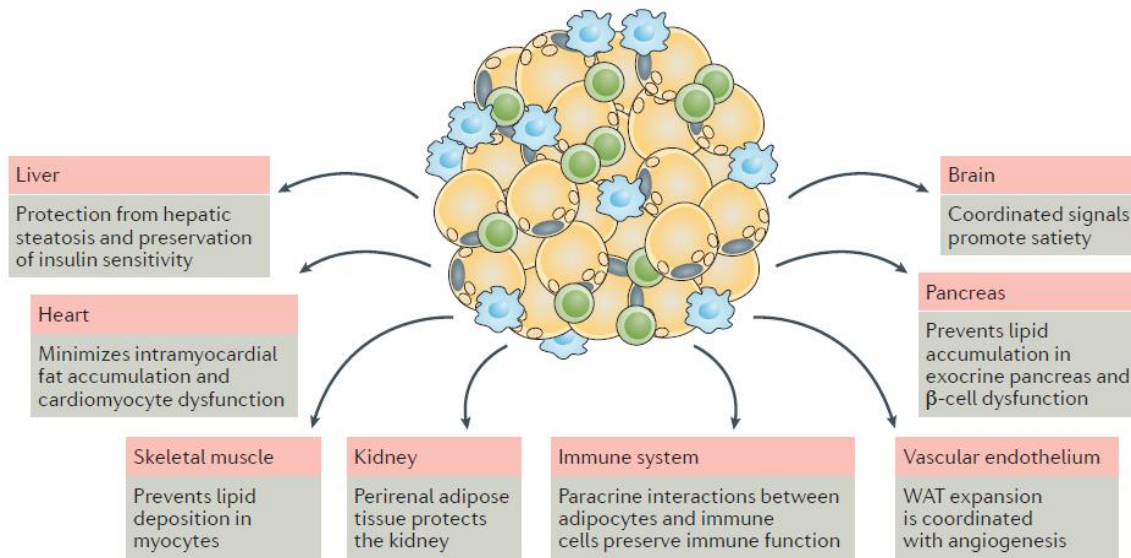
De origem multifatorial, resultante de componentes genéticos e de fatores ambientais como sedentarismo e alimentação inadequada, ou a interação entre eles (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003), a obesidade é uma patologia caracterizada pelo excesso de tecido adiposo, sendo considerada o maior fator relacionado a doenças cardiovasculares e o principal componente da síndrome metabólica (YAN et al., 2007). Tal síndrome está amplamente associada a vários fatores de risco, que envolvem problemas cardíacos e outras doenças crônico-degenerativas, tais como dislipidemia, hiperinsulinemia, o *diabetes mellitus* tipo 2, a esteatose hepática não alcoólica, diminuindo assim, a expectativa de vida (FOSTER-SCHUBERT; CUMMINGS, 2006).

No Brasil, segundo os dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), a obesidade e o excesso de peso têm aumentado rapidamente nos últimos anos, em todas as faixas etárias. Neste levantamento, 50% dos homens e 48% das mulheres são encontrados com excesso de peso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres são considerados obesos. Entre as crianças, 33,5% de crianças entre cinco a nove anos apresentam excesso de peso, sendo que 16,6% do gênero masculino e 11,8 % do feminino eram obesos. Estes dados despertam um alerta já que, como citado anteriormente, uma das doenças crônico-degenerativas decorrentes da obesidade é o *diabetes mellitus* tipo 2. Mundialmente, em 2014, estimou-se que 422 milhões de adultos estavam vivendo com diabetes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A prevalência global (idade-padronizados) de diabetes quase duplicou desde 1980, passando de 4,7% para 8,5% na população adulta. Isso reflete um aumento nos fatores de risco associados, tais como o excesso de peso e obesidade. Durante a última década, a prevalência de diabetes aumentou mais rapidamente em países de baixa e média renda do que nos países de alta renda sendo que a maioria das pessoas com diabetes são afetadas por diabetes do tipo 2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). O número de indivíduos diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, além da crescente prevalência de obesidade e sedentarismo (SBD, 2015). Desta forma, sendo o *diabetes mellitus* tipo 2 uma

desordem metabólica decorrente da obesidade, e a obesidade se caracteriza por um acúmulo excessivo do tecido adiposo, este estudo tem como foco o tecido adiposo e suas interações com o *diabetes mellitus* tipo 2.

O tecido adiposo foi considerado durante décadas como apenas um tecido de reservatório de gorduras. Entretanto, hoje já está claro que o tecido adiposo é também um órgão endócrino, que secreta e libera na circulação peptídeos adipocinas com funções hormonais (CINTI, 2005; KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Com isso, um conceito novo sobre a função biológica desse tecido vem sendo considerada, consolidando a ideia de que não se trata somente de um tecido com funções reguladoras da temperatura corporal, mas sim um órgão dinâmico envolvido em processos metabólicos e fisiopatológicos que podem estar relacionados nas complicações da obesidade como o DM como representado na figura 1 (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Em estado obeso, o tecido adiposo está sob um estado constante de estresse metabólico, resultando na ativação da resposta inflamatória, onde o adipócito libera citocinas, adipocinas e ácidos graxos livres, que podem atuar de forma parácrina ou autócrina o que causa a resistência localizada à ação da insulina. Além disso o tecido adiposo também atua como um órgão endócrino onde estas citocinas e adipocinas atuam no fígado e músculo podendo alterar a sensibilidade à insulina (DE LUCA; OLEFSKY, 2006). Desta maneira, alguns hormônios, tais como leptina e adiponectina, secretados por este órgão estão envolvidos no metabolismo da glicose, mas até agora não foram encontrados estudos que explorem os efeitos de novas adipocinas como vaspina e omentina-1 sobre o comportamento alimentar no modelo experimental utilizando ratos.

FIGURA 1- Tecido adiposo como órgão endócrino



Relação do tecido adiposo como órgão endócrino influenciando em outros órgãos promovendo alterações fisiológicas e celulares que conferem danos, em última análise de lipotoxicidade e disfunção metabólica podendo influenciar no Diabetes tipo 2 (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016).

A vaspina (serpina derivado de tecido adiposo visceral) foi identificada como um membro da família de inibidores de protease (serpina) do tecido adiposo visceral de ratos OLETF (*Otsuka Long Evans Tokushima Fatty*), um modelo experimental de diabetes do tipo 2, caracterizado por obesidade abdominal, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial (HIDA et al., 2005). A vaspina apresenta redução da sua expressão tanto com o uso da insulina como com o uso de drogas para aumentar a sensibilidade insulínica (ANTUNAPUENTE et al., 2008). Em indivíduos diabéticos ou com resistência insulínica os níveis plasmáticos de vaspina estão aumentados, enquanto que, em indivíduos com menor gordura corporal os níveis plasmáticos dessa adipocina se encontram reduzidos (LI et al., 2008).

A maioria dos estudos tem atribuído um papel importante da vaspina no desenvolvimento da obesidade, síndrome metabólica e diabetes, mas não é claro se isto tem efeito causador ou protetor nestas condições. A administração de vaspina a camundongos obesos melhora a tolerância à glicose, a sensibilidade à insulina, e reduz a ingestão alimentar (BLÜHER, 2012). Tem sido assumido que a vaspina serve como um sensibilizador de insulina com os efeitos anti-inflamatórios e pode atuar como um mecanismo de compensação, em resposta à diminuição da sensibilidade da insulina (DIMOVA; TANKOVA, 2015).

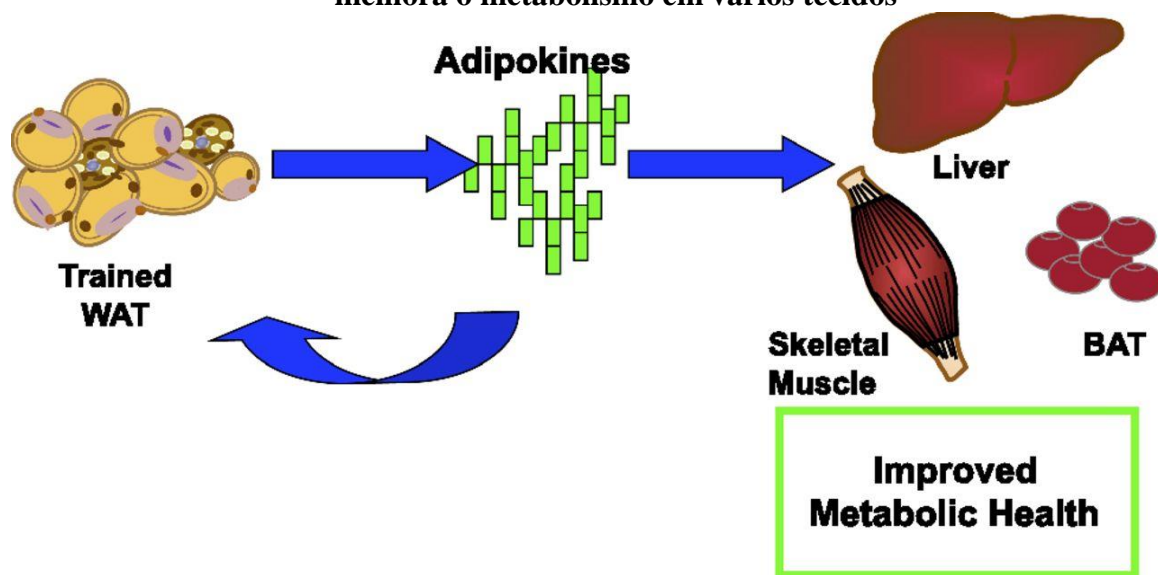
A omentina, outra adipocina, expressa preferencialmente no tecido adiposo visceral (células do estroma vascular visceral), está negativamente associada à resistência

insulina e à obesidade. Esta adipocina pode ter efeito autócrino e parácrino, atuando no metabolismo da glicose. Além disso, por estar presente na circulação sanguínea, também poderia desempenhar uma função endócrina em tecidos como fígado e músculos melhorando a sensibilidade à insulina (MORENO-NAVARRETE et al., 2010). A omentina-1 (isoforma de maior circulação) tem seus níveis plasmáticos e expressão gênica no tecido adiposo visceral inversamente correlacionados com o IMC, circunferência da cintura, níveis de leptina e resistência à insulina, medida pelo *Homeostasis Model Assessment* (HOMA). E por outro lado está positivamente correlacionada com adiponectina (DE SOUZA BATISTA et al., 2007).

A omentina está envolvida na regulação do metabolismo de glicose e oxidação lipídica nos principais tecidos metabólicos como fígado, músculo e tecido adiposo, apresentando relação com a redução de processos inflamatórios. Isto demonstra um papel contra o desenvolvimento de resistência à insulina e o estado pró-inflamatório na obesidade e diabetes tipo 2 (HERNÁNDEZ-DÍAZ et al., 2015a). Embora os níveis circulantes de omentina na obesidade tenham sido adequadamente estudados, sua correlação com a resistência à insulina ou à obesidade ainda é controversa (ALISSA et al., 2016). Dessa forma vê-se a necessidade de estudar o comportamento desta adipocina frente a condição do diabetes.

Uma das intervenções para modular a concentração das adipocinas por alterar sobre a morfologia e propriedades bioquímicas do tecido adiposo branco é o exercício físico (STANFORD; MIDDELBEEK; GOODYEAR, 2015), como mostra a figura 2, mas os efeitos do exercício físico sobre estas adipocinas ainda estão muito controversos. Estudos mostram uma forte correlação entre o desempenho no exercício e os níveis circulantes de omentina, bem como um aumento desta adipocina em resposta a 6 semanas de treinamento em mulheres obesas (WILMS et al., 2015). Mas os resultados da influência do exercício sobre a omentina ainda são escassos uma vez que ela é pouco estudada.

FIGURA 2- Adipocinas induzidas pelo treinamento físico têm um efeito endócrino e melhora o metabolismo em vários tecidos



O exercício provoca alterações no tecido adiposo branco (*white adipose tissue* -WAT) o qual libera adipocitocinas, que podem atuar de um modo endócrino, para melhorar o metabolismo no músculo esquelético, fígado, e tecido adiposo marrom (*Brown adipose tissue* BAT) ou de forma autócrina ou parácrina para melhorar a função de WAT (STANFORD; MIDDELBECK; GOODYEAR, 2015).

Ainda nesse sentido está claro na literatura que o exercício físico é eficaz no tratamento da obesidade (MILLER, 2012) e diabetes (ZANUSO et al., 2010) sendo realizado de forma aeróbica ou anaeróbica (FERNANDEZ et al., 2004). O exercício aeróbico (natação) em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica não foi capaz de alterar os níveis de vaspina no tecido adiposo (SHAKER; SADIK, 2013). Em contrapartida em outros trabalhos o exercício aeróbico aumentou os níveis de vaspina no soro e não alterou a omentina em mulheres com sobrepeso (FARAMARZI et al., 2016), já Saremi et al. (2010) mostrou que a omentina circulante aumentou com o treino aeróbico em indivíduos obesos. Entretanto o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está totalmente esclarecido.

Além disso, o exercício pode provocar alterações estruturais e metabólicas no músculo esquelético (YAN et al., 2011), gerando efeitos positivos na obesidade, como aumento nos níveis sistêmicos de adipocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 (BALDUCCI et al., 2010), bem como a adiponectina, proteína expressa exclusivamente nos adipócitos diferenciados, e que tem ação como fator protetor para doenças cardiovasculares, aumentando a sensibilidade à insulina (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; MIYAZAKI et al., 2010). O exercício físico também é capaz de promover uma diminuição nas adipocinas pró inflamatórias, auxiliando, assim, na prevenção ou atenuação dessas doenças crônicas degenerativas (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Sendo assim, uma forma utilizada para compreender o mecanismo que abarca as alterações metabólicas decorrentes do diabetes mellitus, é a utilização de um modelo experimental que associa o uso de dietas hipercalóricas com baixas doses de estreptozotocina. Estes modelos são considerados eficazes em produzir a resistência à insulina e provocar disfunção inicial na célula- β com subsequente hiperglicemia não-genética (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007; SRINIVASAN et al., 2005a), aproximando este modelo do quadro natural da patologia, bem como as características metabólicas da diabetes de tipo 2 em humanos.

Devido à grande diversidade de protocolos de exercício utilizados em modelos experimentais, estudos utilizando animais são importantes para o entendimento da obesidade e de suas comorbidades, uma vez que pesquisas com seres humanos geralmente são controversas devido às diferenças metodológicas e protocolos utilizados, assim como inúmeros fatores, entre eles genéticos, interativos (gene - meio ambiente), biológicos, psicológicos, que podem influenciar os resultados obtidos (TOU; WADE, 2002). Assim, embora se reconheça a importância do exercício físico na prevenção e tratamento da obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2, particularidades com relação ao efeito do exercício físico de diferentes modalidades, combinadas e em diferentes condições metabólicas, ainda estão pouco esclarecidas.

Dessa forma, o presente estudo se propõe a avaliar o efeito crônico do exercício aeróbico (corrida), do treinamento de força (escada), e da combinação dos dois tipos de exercício na expressão proteica das adipocinas, Omentina e Vaspina pelo tecido adiposo de ratos obesos com diabetes *mellitus* tipo 2.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O presente estudo tem como objetivo verificar os efeitos de três diferentes protocolos de exercício (escada, esteira e combinado) sobre a produção de adipocinas Omentina e Vaspina em ratos obesos com *diabetes mellitus* tipo 2.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a efetividade da indução do diabetes tipo 2;
- Avaliar os níveis de Omentina e Vaspina no tecido adiposo visceral, soro, fígado e músculo em ratos não-diabéticos frente aos protocolos de exercício;
- Avaliar os níveis de Omentina e Vaspina no tecido adiposo visceral, soro, fígado e músculo em ratos diabéticos frente aos protocolos de exercício;
- Determinar os níveis de mediadores inflamatórios do sistema imune como IL-6 (Interleucina-6), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α); IL-10 (Interleucina-10); IL-4 (Interleucina-4); CXCL8 (Interleucina-8); Proteína C Reativa (PCR); Adiponectina nestes grupos experimentais;
- Avaliar a relação entre Omentina e Vaspina e os marcadores inflamatórios;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 90 ratos *Wistar*, com idade de 45 dias, provenientes do Biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais e permaneceram no Biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados ao Exercício, pertencentes ao Departamento de Educação Física e Motricidade Humana, em temperatura ambiente entre 22 e 25°C. Estes animais passaram por um período de 45 dias para aclimação e inversão do ciclo claro /escuro com luz controlada em ciclo de 12h. A água e a comida foram *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Protocolo nº 008/2013).

3.2 Grupos experimentais

Dos 45 aos 90 dias de idade, os ratos consumiram dieta padrão para ambientação. Quando completaram 90 dias de idade eles foram distribuídos randomicamente em 8 grupos experimentais (Figura 3):

Grupo controle sedentário não-diabético (SN): Composto por 10 animais sedentários saudáveis que receberam dieta padrão, não tendo nenhuma participação nos protocolos de treinamento;

Grupo com treinamento resistido não-diabético (TRN): Composto por 10 animais que receberam dieta padrão, uma dose de 1 ml de tampão citrato e foram submetidos a treinamento resistido de alta intensidade;

Grupo com treinamento aeróbico não-diabético (TAN): Composto por 10 animais que receberam dieta padrão, uma dose de 1 ml de tampão citrato e submetidos a treinamento aeróbico moderado;

Grupo com treinamento combinado aeróbico/resistido não-diabético (TCN): Composto por 10 animais que receberam dieta padrão, uma dose de 1 ml de tampão citrato e submetidos aos 2 protocolos de treinamento: aeróbico e resistido.

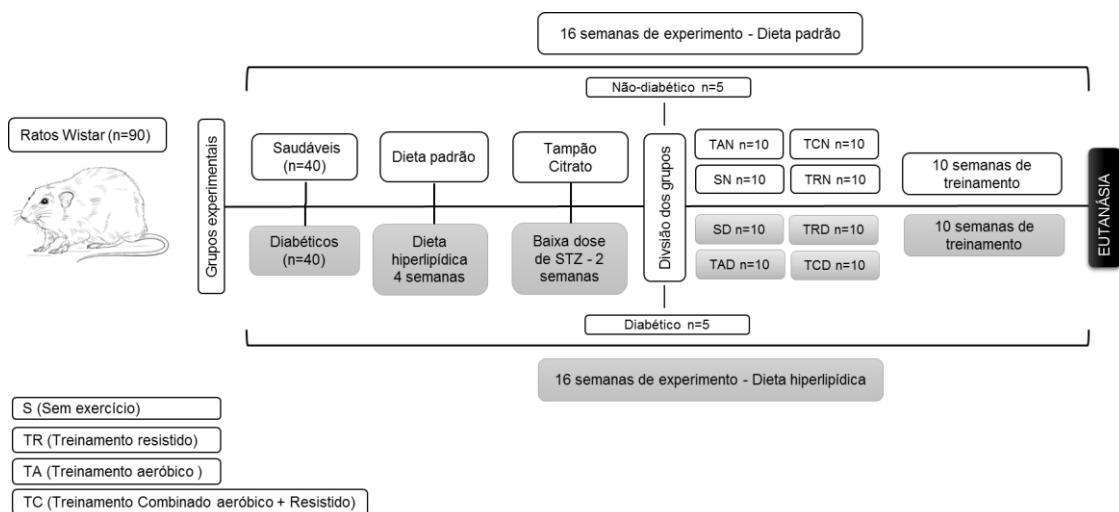
Grupo controle sedentário obeso/diabético (SD): Composto por 10 animais que receberam dieta hiperlipídica, uma dose de estreptozotocina (35mg/kg) não tendo nenhuma participação nos protocolos de treinamento;

Grupo com treinamento resistido obeso/diabético (TRD): Composto por 10 animais que receberam dieta hiperlipídica, uma dose de estreptozotocina (35mg/kg) e foram submetidos a treinamento resistido de alta intensidade;

Grupo com treinamento aeróbico obeso/diabético (TAD): Composto por 10 animais que receberam dieta hiperlipídica, uma dose de estreptozotocina (35mg/kg) e foram submetidos a treinamento aeróbico moderado;

Grupo com treinamento combinado aeróbico/resistido obeso/diabético (TCD): Composto por 10 animais que receberam dieta hiperlipídica, uma dose de estreptozotocina (35mg/kg) e foram submetidos aos 2 protocolos de treinamento: aeróbico e resistido.

FIGURA 3- Desenho experimental



3.3 Dieta

Dieta Padrão

A dieta padrão utilizada foi a MP-77 da marca Primor[®] (São Paulo, Brasil), em forma de pellets e própria para roedores, (Tabela 1). Esta dieta foi ofertada aos grupos não diabéticos.

Dieta Hiperlipídica

A dieta hiperlipídica foi oferecida aos animais dos grupos diabéticos para a indução da obesidade. Foi preparada por uma mistura hiperlipídica, na seguinte proporção: 15g de ração padrão MP-77 da marca Primor[®] (São Paulo, Brasil); 10g de amendoim torrado; 10g de chocolate ao leite; 5g de bolacha maisena. Esses constituintes foram moídos e misturados na proporção de 3:2:2:1. A densidade calórica das dietas (Tabela 1) foi de 5,12 Kcal/g para a dieta hiperlipídica e 4,07 Kcal para a dieta padrão segundo (ESTADELLA et al., 2004).

TABELA 01 - Composição das dietas

Macro nutrientes	Dieta padrão (Primor[®]) (g/100g)	Dieta Hiperlipídica palatável (g/100g)
Carboidratos	49	48
Proteínas	23	20
Gorduras totais	4	20
Fibras	5	4
Valor energético	4,07 kcal/g	5,12 kcal/g

Bromatologia (ESTADELLA et al., 2004)

3.4 Indução do Diabetes tipo 2

Os animais dos grupos diabéticos, após receberem dieta hiperlipídica por 4 semanas, receberam, após jejum prévio, uma dose de Estreptozotocina (Sigma[®]) de 35 mg/kg de peso do animal, via intraperitoneal, pH 4,4 em 1 ml de solução citrato. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia ≥ 250 mg/dl (SRINIVASAN et al., 2005a).

3.5 Controle da massa corporal e Consumo Alimentar

A massa corporal bem como o consumo alimentar de cada animal foi mensurado diariamente, durante todo o período experimental. O consumo alimentar foi calculado através da diferença de peso entre a ração ofertada e o restante.

3.6 Acompanhamento do diabetes *mellitus* tipo 2

Os níveis sanguíneos de glicose foram avaliados semanalmente. Já a insulina foi avaliada ao final do período experimental. Seis animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para realização do teste de tolerância à insulina.

Determinação da glicose e da insulina.

A dosagem da glicose plasmática foi realizada utilizando um glicosímetro Accu-Check (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA). A quantificação de insulina nas amostras de soro foram dosadas por kit comercial Kit Insulin RatElisa kit (Abnova, Catalogo KA3811) segundo as características do fabricante. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em uIU/ml. A partir dos valores de glicemia e insulina foram calculados o modelo de avaliação de homeostase (HOMA - *homeostasis model assessment*) para estimar a resistência insulínica, em que $HOMA-IR = (\text{insulinemia de jejum [mU/L]} \times \text{glicemia de jejum [mg/dL]})$, e para determinação da capacidade funcional das células beta (βcC), em que $HOMA-\beta cC = (20 \times \text{insulinemia de jejum [mmol/L]}) / (\text{glicemia de jejum [mmol/L]} - 3,5)$. Para o cálculo, utilizou-se o software HOMA Calculator©, version 2.2, *Diabetes Trial Unit, University of Oxford*©.

Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT)

O teste foi realizado ao final do período experimental. Após jejum noturno de 6 h a primeira coleta de sangue foi realizada (tempo 0) do teste. Após isso, a insulina (1U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos: 0, 15, 30 e 45 minutos para a determinação da curva glicêmica (ROPELLE et al., 2006).

3.7 Protocolos de Treinamento

Os treinamentos aeróbicos e resistido foram iniciados após seis semanas do início da dieta hiperlipídica e a indução com STZ e teve duração de 10 semanas. Todas as sessões de exercício foram realizadas três vezes na semana.

Treinamento Aeróbico

Para a realização do exercício aeróbico foi utilizado o protocolo de corrida em esteira (IRIGOYEN et al., 2005). Nas duas primeiras semanas de treinamento os animais passaram por um processo de adaptação a corrida. Nas semanas seguintes os animais foram submetidos a um programa progressivo de corrida, com intensidade moderada, 3 vezes por semana, chegando ao final do experimento à 30 minutos diários com uma velocidade de 20 m/min.

Treinamento Resistido

O protocolo de Hornberger & Farrar (2004) foi adaptado para as necessidades e execução da pesquisa. Inicialmente os ratos foram familiarizados com o treinamento de força que consiste em subida de escadas (1,1 x 0,18m, 2-cm espaçamento entre os degraus da grade, 80° de inclinação) com uma carga de aparatos fixados em sua cauda. No topo da escada, há uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) onde descansam por 120 segundos. Este procedimento foi então repetido até que os ratos voluntariamente subam a escada sem o incentivo da pinçada na cauda.

A partir da adaptação, foi feito o teste de carga máxima, onde os grupos experimentais começaram um regime de exercício resistido progressivo de alta intensidade. A primeira sessão de treinamento consistiu em escalar de quatro a nove vezes carregando progressivamente cargas mais pesadas. Na escalada inicial foi aplicado 75% do peso do corpo do animal. Após completar o carregamento desta carga com sucesso, um peso adicional de 30 gramas foi adicionado ao aparato. Este procedimento foi sucessivamente repetido até que a carga levasse o animal a exaustão, ponto no qual foi considerado a carga máxima dos ratos para aquela sessão. As sessões de treinos subsequentes consistiram de quatro a nove escaladas. Durante as primeiras quatro escaladas, os ratos carregaram 50%, 75%, 90% e 100% de sua carga máxima. Durante as subsequentes escaladas, um adicional de 30 gramas foi adicionado até que o rato obtivesse uma nova capacidade máxima de carregamento. Este treinamento foi repetido três vezes por semana.

Treinamento Combinado

Para a realização do exercício combinado os animais fizeram o protocolo de escada pela manhã e o de esteira no período da tarde, priorizando um intervalo de no mínimo 6 horas entre cada sessão. Nas duas primeiras semanas de treinamento os animais passaram por um processo de adaptação a corrida e a escada. Os animais foram submetidos a um programa de exercício 3 dias por semana.

3.8 Experimentos e Coleta de Amostras

A eutanásia foi realizada por decapitação em guilhotina, ao final das 10 semanas de treinamento, 72 horas após a última sessão de exercício. O sangue, os tecidos adiposos brancos retroperitoneal (RET), epididimal (EPI) e visceral (VIS), músculo gastrocnêmio (GAST), o fígado (FIG) e o pâncreas foram coletados e estocados em freezer a -80°C.

3.9 Perfil lipídico

As determinações bioquímicas do soro, colesterol total, HDL-colesterol e Triglicerídeos, Acido úrico, foram realizadas por kits Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda (Pinhais/PR), segundo as recomendações do fabricante.

3.10 Concentrações séricas de Lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK)

As concentrações séricas de creatinaquinase (CK) foram quantificadas utilizando-se kit comercial (Bioclin – K010) (SCHIMID e FORSTNER, 1986). A CK converte a creatina fosfato e ADP em creatina e ATP que juntamente com a glicose é convertida, via ação da hexoquinase em glicose-6-fosfato e ADP. A glicose-6-fosfato e NADP⁺ são convertidas, via ação da glicose-6-fosfato-desidrogenase, em gluconolactona-6-fosfato e NADPH. A velocidade de redução do NADP⁺ em NADPH é proporcional à atividade de CK na amostra. Os níveis séricos de Lactato desidrogenase (LDH) foram analisados utilizando kit comercial (Bioclin – K014), por método de espectrofotômetro baseado na redução do piruvato para ácido láctico acoplado a oxidação do NADH como relatado por Korkeniewski e Callewart (1983).

3.11 Análise de Glicogênio Muscular e Hepático

As determinações de glicogênio foram realizadas como descrito por Bidinotto e colaboradores (1997). Os tecidos foram descongelados e alíquotas de 100 mg foram separadas em tubos de ensaio com 1 ml de KOH 6N e levados ao banho fervente por 5 minutos. Logo após os tubos foram agitados levemente para dissolução completa dos tecidos e 200 µl do extrato foram transferidos para outro tubo. Neste tubo foram adicionados 3 ml de Etanol P.A.

e então, o tubo foi agitado por 30 segundos em vórtex. Depois, 100 µl de K₂SO₄ 10% foram adicionados e o tubo foi novamente agitado no vórtex por 30 segundos. Logo após os tubos foram centrifugados a 3000 RPM durante 3 minutos. Então, 2,5 ml de água destilada foram adicionados e o tubo foi novamente agitado no vórtex, até a diluição total do *pellet*. Após isso, foram adicionados 500 µl de fenol e 2 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A concentração de açúcar foi estimada em uma concentração padrão de glicose 1mM e a amostra foi lida em espectrofotômetro com uma absorbância de 480 nm.

3.12 Concentrações séricas de citocinas e adipocinas

As quantificações de citocinas e adipocinas foram realizadas a partir da coleta do soro e determinadas pelo método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), seguindo as especificações correspondentes aos Kits. Para as análises de citocinas como, IL-4, IL-10, IL-6, TNF- α foram utilizados kits OptEIA (BD Biosciences); para as análises de CXCL-8 (IL-8), Proteína C-reativa (PCR), e adiponectina foram utilizados kits DuoSet ELISA (R&D Systems®); para as análises de Omentina e Vaspina foram utilizados kits EIA- OME e EIA-VAP (RayBiotech®). Para isto, o sangue coletado foi acondicionado em tubos sem anticoagulante por aproximadamente 2 horas até a sua coagulação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos. O soro resultante desta centrifugação foi aliquotado em microtubo e congelado a -80°C. De modo geral a técnica se baseia no modelo ELISA sanduíche: As microplacas de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas e permaneceram “overnight”. As placas foram lavadas 3 vezes com 300 µl/poço de PBS pH 7,2-Tween-20 0,05% (PBS-Tw), e incubadas com a solução bloqueadora contendo albumina (PBS pH 7,2 + 4% Albumina bovina) por 1h, a temperatura ambiente (TA). Em seguida após mais um ciclo de lavagens foram adicionados as amostras e efetuados curvas padrão de citocinas recombinantes. As placas foram mantidas a TA por 2 horas e, em seguida, foi realizada uma nova lavagem. Foram então adicionados anticorpos anti-citocinas biotinizados ou conjugado com enzima peroxidase e mantidos por 1 hora e 30 minutos a TA. Após 5 lavagens com PBS-Tw, foi adicionado 100 µl da solução reveladora contendo 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi bloqueada com 50 µl de ácido sulfúrico 1 M e a leitura realizada no espectrofotômetro em 450nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/ml ou ng/ml dependendo do kit.

3.13 Western Blotting

A quantificação de omentina e vaspina nos tecidos (tecido adiposo visceral, epididimal, fígado, musculo) foi realizada pela técnica de western blotting. Os tecidos foram processados para obter o extrato proteico total utilizando de tampão de extração de proteína (SDS 0,1 % (p/v); Triton 1 % (v/v); Tris-HCl pH 7,5 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 15 mM; EGTA 5 mM; NaF 100 mM; Na₂P₂O₇ 10 mM), adicionado de inibidores de protease (Complete-mini Roche® 1x) e de fosfatases (PhosSTOP, Roche® 1x). As amostras foram centrifugadas a 8000g por 20 minutos a 4 °C para a retirada do material precipitado. O sobrenadante de cada amostra foi congelado e estocado a -80 °C. A integridade da proteína foi verificada através de eletroforese em gel SDS-PAGE 12% e quantificada pelo método colorimétrico de Lowry (1951). Os extratos brutos proteicos referentes a cada experimento foram submetidos a eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), 12 % e tampão Tris-glicina 1x (Método de Laemmli), utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (BioRad). As proteínas foram então transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (0.45 µm, Bio-Rad) em procedimento de transferência submerso de acordo com o protocolo do fabricante. O bloqueio das membranas foi feito com TBST 1x contendo 9% de leite em pó desnatado, por 4 horas em Temperatura Ambiente. As membranas foram então incubadas com o anticorpo primário anti-Omentina (1-1000, sc-104334, Santa Cruz®) e anti-Vaspina (1-1000, sc-79815, Santa Cruz®) TBST 1x contendo 5% de leite em pó desnatado, por 16 horas a 4 °C. A membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado anti-goat IgG-HRP: (1-3000, sc-2020) em TBST 1x a temperatura ambiente por 2 horas, feita a lavagem de 3x de 5 min com TBST 1x e a imunodeteção foi realizada através do uso do kit de quimioluminescência (ECL Prime, GE Healthcare, Life Sciences) e a detecção quimioluminescente foi feita pelo equipamento Chemidoc (Bio Rad). Os valores foram relativizados pelos endógenos anti-β-actina (1:1000, Cell Signaling®, 8H10D10) para o tecido adiposo e para os demais tecidos o anti-GAPDH (1:10.000; Abcam®, ab8245).

3.14 Análise Histológica do Pâncreas

Para análise histopatológica, fragmentos do pâncreas foram imersos em solução de formalina a 10% durante 24 horas, desidratados em etanol e incluídos em paraplast. Os procedimentos histológicos seguiram a metodologia descrita em (Rashid & Sil 2015). Secções de 7 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Lupetec -

MRP09, São Carlos – SP), coradas com hematoxilina-eosina e montadas com Entellan® (Merck, Alemanha). Para análise do pâncreas foram capturadas 10 imagens para cada animal utilizando-se objetiva de 20x do microscópio de luz (Motic B3-220/223 Compound Microscope, Hong Kong, China).

3.15 Análise estatística

Testes paramétricos foram usados quando os dados apresentavam distribuição normal (método Kolmogorov-Smirnov) e igualdade de variância (método de Levene), e testes não paramétricos foram usados quando os dados não apresentavam distribuição normal e/ou igualdade de variância.

O test-t independente foi usado para comparações entre dois grupos independentes. O teste paramétrico de análise de variância para um fator (one way ANOVA) foi usado para comparações envolvendo 3 ou mais grupos com apenas um fator. O teste não paramétrico Kruskal Wallis foi usado quando o teste one way ANOVA foi contra indicado, ou seja, quando não cumpria as exigências para uso de teste paramétrico. O teste de comparações múltiplas de Bonferroni foi utilizado quando o teste one way ANOVA detectava diferença estatística. Para situações em que o teste Kruskal Wallis detectava diferença estatística, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Dunn's.

O teste paramétrico de correlação de Pearson foi usado para correlacionar variáveis. Para todos os testes utilizados, o erro máximo permitido para assumir a existência de diferença entre os grupos foi de 5% ($p=0,05$). O programa estatístico usado para todas as análises foi o *software SigmaStat (versão 3.5)*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Capítulo 1: Indução do diabetes

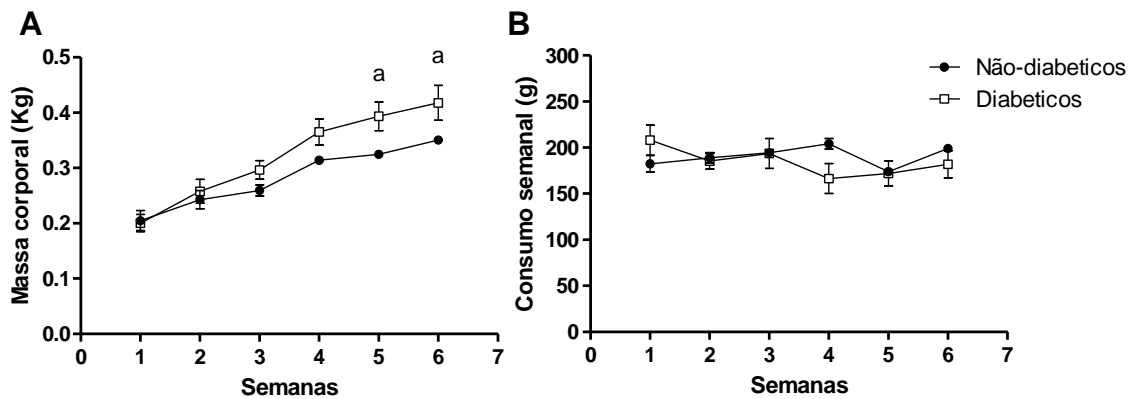
O objetivo deste capítulo foi verificar a eficácia da indução do diabetes e o comportamento de omentina e vaspina circulantes e sua relação e a inflamação.

Resultados

Evolução ponderal e consumo alimentar

A Figura 4 mostra a evolução ponderal (A) e a ingestão alimentar (B) durante as seis semanas. Embora a ingestão alimentar não apresente diferença entre os dois grupos (Figura 4B), os valores de massa corporal foram significativamente mais elevados na semana 5 e 6 (Figura 4A) no grupo diabético quando comparado com os grupos não-diabéticos.

FIGURA 4 - Evolução ponderal e consumo alimentar.



Dados representados como média \pm EP, n= 5; ^a p < 0.05 vs. não-diabético (Teste - t de Student).

Variáveis metabólicas

A Tabela 02 mostra as variáveis metabólicas em ambos os grupos durante todo o período experimental. Os níveis de Triglicerídeos, Colesterol Total, HDL-c e a glicemia

aumentou no grupo diabético em relação ao grupo não-diabético. A concentração sérica de insulina não teve diferença estatística entre os grupos, mas a função da célula β foi significativamente reduzida no grupo diabético e o HOMA-IR foi maior neste grupo.

TABELA 02- Parâmetros metabólicos dos grupos experimentais

	Não-diabéticos	Diabéticos
Triglicerídeos (mg/dL)	87,89±7,28	142,81±13,14 ^a
Colesterol total (mg/dL)	39,28±3,58	52,47±3,54 ^a
HDL-c (mg/dL)	32,19±2,23	44,51±1,41 ^a
Glicose (mg/dL)	100,75± 18,02	370,50±12,52 ^a
Insulina (uIU/ml)	18,64±2,09	17,67±3,08
HOMA-IR	2,44 ± 0,27	6,45 ± 1,43 ^a
Função Células - β (%)	134,58 ± 8,65	16,00 ± 2,63 ^a

Dados representados como média \pm EP, n= 5; ^a p < 0.05 vs. não-diabético (Teste - t de Student).

Peso dos tecidos

O peso relativo do fígado e do pâncreas nos animais diabéticos não foi diferente quando comparado ao controle não-diabético (Tabela 03). Já o peso relativo dos depósitos de gordura abdominal, visceral, retroperitoneal e epididimal foi maior no grupo diabético (Tabela 3).

TABELA 03 - Peso relativo dos tecidos fígado, pâncreas, e depósitos de gordura abdominal (g/100g peso corporal).

	Fígado	Pâncreas	Depósitos de gordura abdominal		
			VIS	RET	EPI
Não-diabético	3,19±0,11	0,26±0,01	0,81±0,13	1,17±0,22	1,03±0,12
Diabético	3,41±0,09	0,21±0,02	1,70±0,33 ^a	2,73±0,52 ^a	2,22±0,42 ^a

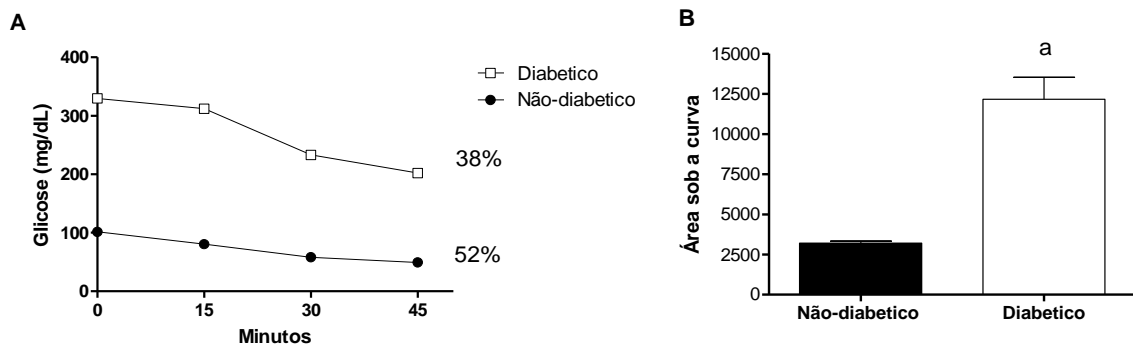
Dados representados como média \pm EP, n= 5; ^a p < 0.05 vs. não-diabético (Teste - t de Student). VIS, tecido adiposo visceral omental; RET, tecido adiposo retroperitoneal; EPI, tecido adiposo epididimal.

Teste de tolerância a insulina

A Figura 05 mostra os resultados do teste de tolerância à insulina e área sob a curva do grupos não-diabético e diabético. O teste de tolerância à insulina mostra uma queda de 52% no grupo não-diabético, enquanto no grupo diabético ocorreu uma diminuição de

apenas 38%. A área sob a curva mostra o aumento no grupo diabético em relação ao grupo não-diabético, como o esperado.

FIGURA 5 - Teste de tolerância a insulina (TTI).

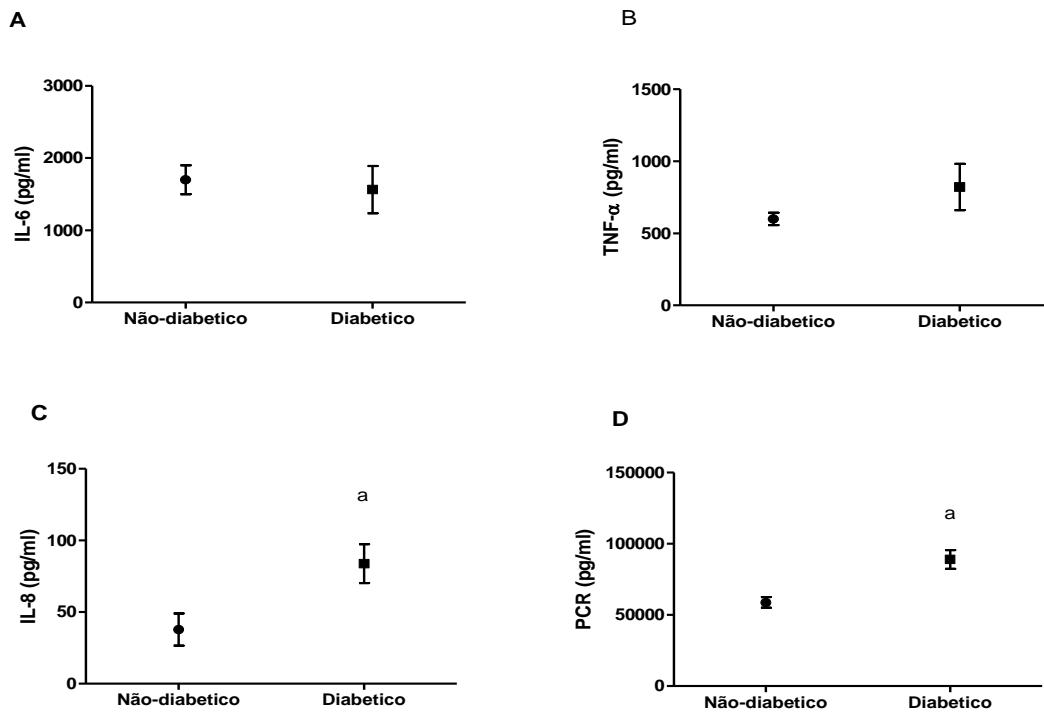


Dados representados como média \pm EP, n= 5; ^a p < 0.05 vs. não-diabético (Teste - t de Student).

Citocinas séricas

As concentrações séricas de interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8, CXCL8), Fator de Necrose tumoral - alfa (TNF- α) e proteína C-reativa (PCR) estão apresentados na Figura 4. Não há diferenças significativas entre a IL-6 (Figura 6A) (não-diabético, $1699,05 \pm 200,30$; diabético, $1563,96 \pm 326,63$) e TNF- α (Figura 6B) (não-diabético, $600,96 \pm 42,62$; diabético, $821,97 \pm 160,70$) entre os grupos. Por outro lado, os valores de IL-8 (Figura 6C) foram maiores no grupo diabético ($83,86 \pm 13,56$) em comparação com o grupo não-diabético ($37,84 \pm 11,22$) (Figura 6C). O mesmo aconteceu para a concentração sérica de PCR (não-diabético, $2943,66 \pm 188,97$; diabético, $4453,35 \pm 333,03$) (Figura 6D).

FIGURA 6 - Citocinas no soro.

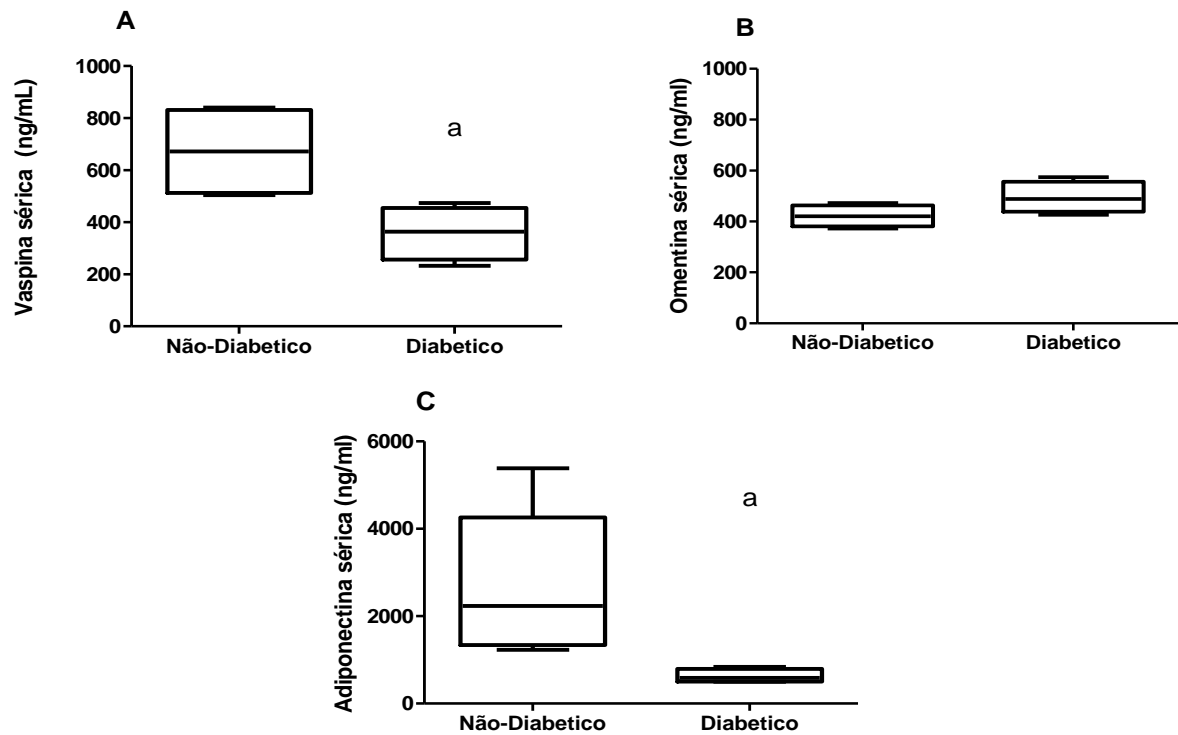


Dados representados como média \pm EP, n= 5; ^a p < 0.05 vs. não-diabético (Teste - t de Student).

Adipocinas séricas

A concentração sérica de vaspina foi menor no grupo diabético ($358,40 \pm 51,18$) quando comparado com o não-diabético ($672,25 \pm 87,58$). No entanto, os valores de omentina não diferiram entre os grupos (não-diabético, $421,60 \pm 21,18$; diabético, $494,60 \pm 30,81$), em contrapartida os níveis de adiponectina foram significativamente reduzidos no grupo diabético ($628,13 \pm 79,71$) em comparação com não-diabético ($2683,69 \pm 753,91$) (Figura. 7C).

FIGURA 7-Concentração sérica de vaspina, omentina e adiponectina.

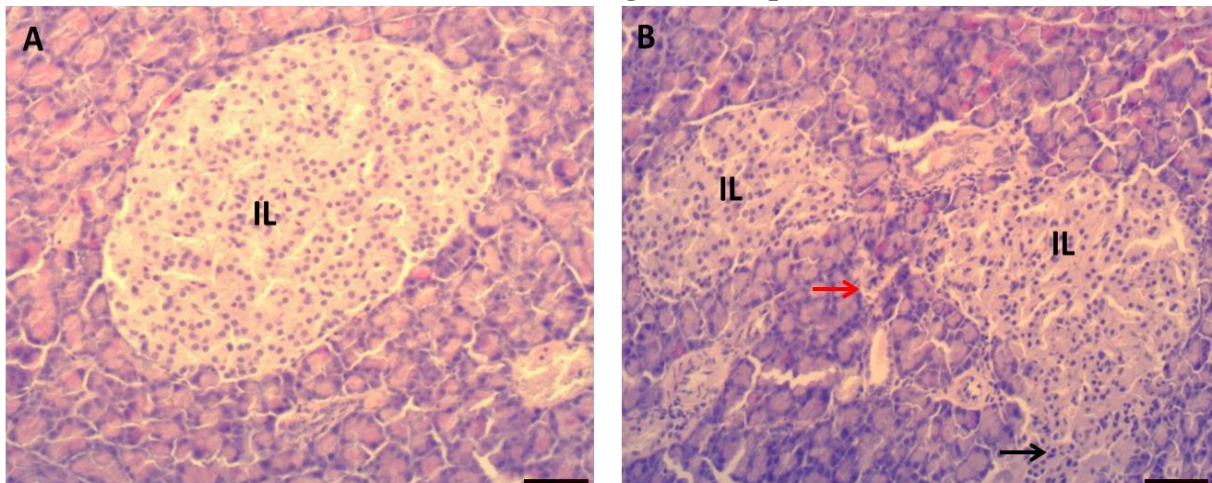


Dados representados como média \pm EP, n= 6; ^a p < 0.05 vs. não-diabético (Teste - t de Student).

Histologia do pâncreas

As foto-micrografias histológicas de tecidos pancreáticos são apresentadas na figura 8. Para o grupo não-diabético, observou-se uma arquitetura lobular normal no tecido pancreático (Figure 8A). Por outro lado, a Figura 8B mostra uma área reduzida e formas distorcidas de ilhotas de Langherans, bem como a presença de infiltrado inflamatório.

FIGURA 8-Foto micrografias do pâncreas.



A – Não-Diabético, ilustrando a arquitetura lobular normal com Ilhotas de Langherans (IL) circundada pelos ácinos pancreáticos; B- Diabético (dieta hiperlipídica com baixa dose de STZ 35mg/kg), mostrando a fronteira indistinta entre as regiões endócrinas e exócrinas, formas distorcidas de ilhotas de Langherans, ilhotas atrofiadas (setas vermelhas); infiltrado inflamatório (setas pretas) que se infiltram através do tecido conjuntivo nas áreas de Ilhotas pancreáticas. (Hematoxilina-Eosina - HE), 20x. Escala Bar: 65µm.

Discussão

A omentina e vaspina são adipocitocinas que parecem estar relacionadas com risco metabólico, mas há pouco estudos sobre seu comportamento no diabetes tipo 2. A utilização deste modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 2, que associa o uso de dieta hiperlipídica e baixas doses de estreptozotocina (STZ), é considerada uma forma eficaz de alcançar a resistência à insulina, bem como causar a disfunção de células beta no início da patologia e subsequente hiperglicemia não-genética (SRINIVASAN et al., 2005b; WILSON; ISLAM, 2012).

O modelo utilizado neste estudo se aproxima do estado natural da patologia, bem como as características metabólicas do diabetes mellitus tipo 2, em seres humanos. Observamos maior ganho de massa corporal no grupo diabético, além de pronunciado aumento no peso relativo dos depósitos de gordura abdominal. Neste caso, é importante considerar que, nos ratos alimentados com dieta hiperlipídica a ingestão calórica é maior do que nos animais que consumiram a dieta padrão, o que representa uma maior contribuição para a deposição de gordura (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007), como observamos em nosso estudo onde o peso relativo dos depósitos de gordura abdominal foi maior no grupo diabético. Estudos experimentais têm demonstrado que o consumo de dieta hiperlipídica provoca alterações metabólicas em 3 semanas de ingestão (DUARTE et al., 2008). Isso pode

explicar o aumento do TG e colesterol nos diabéticos após 6 semanas de consumo da dieta hiperlipídica. A ingestão alimentar foi semelhante em ambos os grupos, mas a ingestão calórica total foi maior no grupo que consumiu a dieta hiperlipídica, o que significa maior eficiência metabólica desta dieta, conforme relatado anteriormente por outros trabalhos (DUARTE et al., 2008; SENE-FIORESE et al., 2008).

Sabe-se que a aplicação de STZ provoca a destruição seletiva de células- β nas ilhotas de Langherans o que resulta numa redução nos níveis de insulina (ROEP, 2003), conseqüentemente um aumento na glicemia. Após 2 semanas da aplicação de doses baixas de STZ, observamos uma mudança parcial de ilhotas pancreáticas, com alterações morfológicas acentuadas, incluindo estruturais como fronteira indistinta entre as regiões endócrinas e exócrinas, formas distorcidas de ilhotas de Langherans, ilhotas atrofiadas, infiltrado inflamatório e células degeneradas com núcleos picnóticos. Estas alterações foram acompanhadas de Ilhotas com estrutura preservada para que haja ainda produção de insulina, caracterizando o modelo tipo 2. Além disso, foi observado uma baixa função da célula β e alto valor de HOMA-IR o que indica maior resistência a insulina nestes animais.

Além das alterações provocadas no metabolismo glicídico, os animais diabéticos também apresentaram alterações no perfil lipídico como aumento dos níveis séricos de TG, HDL e colesterol total, corroborando com outros estudos (MU et al., 2006; SRINIVASAN et al., 2005b; WILSON; ISLAM, 2012). Sabe-se que a dieta rica em gordura pode resultar no aumento da adiposidade visceral (retroperitoneal, visceral e epididimal), aumento da gordura no fígado, e mudanças no perfil lipídico (BORST; CONOVER; BAGBY, 2005; ESTADELLA et al., 2004; IOSSA et al., 2003; WOODS et al., 2003). Somado a estas alterações, podemos observar alterações no perfil inflamatório de ratos diabéticos. Estudos têm mostrado a participação direta de citocinas séricas expressas pelo tecido adiposo, tais como IL-6, IL-8, TNF- α e adiponectina com o metabolismo da glicose e diabetes (DEROSA et al., 2013; FLEHMIG et al., 2014; OUCHI et al., 2011).

Em nosso estudo, os níveis da quimiocina inflamatória IL-8 (CXCL8) e de proteína C-reativa (PCR) foram mais elevadas no grupo diabético, mas a concentração de IL-6 e TNF- α , embora apresentasse maior nos grupos diabéticos, não demonstrou qualquer diferença estatística. Corroborando o nosso achado, Fidan et al. (2005) mostrou que os animais diabéticos induzidos com STZ não diferiram na concentração sérica de TNF- α e IL-6 quando comparados com seus grupos controle. Em contrapartida Pradhan et al. (2001) encontram níveis plasmáticos de IL-6 aumentados em pacientes com diabetes tipo 2. Estes resultados controversos também acontecem com a citocinas TNF- α , que é produzida

principalmente por macrófagos e monócitos e desempenha um papel importante em doenças inflamatórias e autoimunes (LEE; LEE; CHOUE, 2013). Sua expressão pode estar aumentada no tecido adiposo de ratos com obesidade e diabetes do tipo 2 experimental (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; NIETO-VAZQUEZ et al., 2008). Mas estes resultados controversos podem ser decorrentes de diversos fatores como momento da evolução da doença, uma vez que estes valores se referem a concentração sistêmica e esta pode ser influenciada por todo o corpo e não só pelo tecido adiposo (POPKO et al., 2010).

O aumento de citocinas inflamatórias como a IL-6 e TNF- α esta diretamente relacionada com a hipertrofia do tecido adiposo o que gera hipóxia e altos níveis de estresse oxidativo levando a um aumento destas citocinas. Este fato pode ser decorrente de uma alta e inadequada ingestão calórica que pode influenciar o acúmulo de gordura no tecido adiposo causando a hipertrofia do adipócito (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Estas citocinas podem provocar um aumento da resistência à insulina em células como adipócitos, células musculares e células hepáticas, que estão associadas com as alterações sistêmicas da sensibilidade à insulina e homeostase da glicose. Os níveis mais altos de citocinas pro inflamatórias estimula a liberação de PCR pelo fígado, sendo esta citocina encontrada na fase inicial de diabetes tipo 2 e suas concentrações séricas aumentam à medida que a doença progride (FESTA et al., 2002; HU et al., 2004).

Portanto, estas vias podem levar a níveis mais elevados de citocinas pró inflamatórias de fase aguda como IL-6 e TNF- α , que promove a liberação de IL-8 (CXCL8) (FAIN, 2010). Mesmo não tendo diferença significativa, o leve aumento do TNF- α pode ter sido necessário para desencadear a liberação de IL-8 e assim estimular o aumento de PCR. Além disso, os níveis de IL-8 são correlacionados positivamente ao aumento da massa gorda (FAIN, 2010) e isto pode explicar o aumento da IL-8 sem ter grandes alterações no níveis sistêmicos de IL-6 e TNF- α , como ocorreu em nosso estudo, uma vez que nós encontramos um aumento do peso relativo dos depósitos de gordura abdominais nos ratos diabéticos. O aumento de IL-8 e a PCR indica que, possivelmente, está ocorrendo um recrutamento de células inflamatórias nos tecidos associados com a obesidade abdominal. Estes fatos em conjunto colaboram para um aumento do processo inflamatório e contribuem para o aumento de lesões associadas ao diabetes do tipo 2 neste modelo.

A omentina, vaspina e adiponectina são algumas das adipocitocinas secretadas por tecido adiposo e podem estar envolvidas com a inflamação. Alguns estudos mostram que a omentina pode participar na resposta imune produzindo efeitos metabólicos benéficos e também desempenhar um papel anti-inflamatório importante em condições como obesidade e

diabetes, que se encontram em estados inflamatórios crônicos (HERNÁNDEZ-DÍAZ et al., 2015b). Neste estudo após a indução do diabetes experimental tipo 2 a concentração sérica de omentina não foi diferente em relação ao grupo não-diabético. Este resultado não era esperado uma vez que a literatura mostra que a omentina pode estar significativamente reduzida em ratos obesos, quando comparado com a não obesos (FENG et al., 2013). Embora em outros estudos, mostraram semelhança nas concentrações de omentina entre os grupos de obesos e não-obesos (DEROSA et al., 2013; SZKUDELKA; NOGOWSKI; SZKUDELSKI, 2014). Em contrapartida, outro estudo encontrou aumento de omentina sérica em ratos com diabetes tipo 1 induzida por STZ (AKBARZADEH et al., 2014). Assim o comportamento e a extra função da omentina não está bem descrita na literatura. No entanto, estes resultados mostram que tais alterações, seja aumentos ou diminuições, estão relacionados com a fisiopatologia do diabetes, o que pode ser considerado como ponto importante deste processo.

Os efeitos da vaspina ainda são pouco claros, no entanto, até agora sabe-se que, em ratos, é expressa em adipócitos de tecidos adiposo visceral e que está envolvida no controle da sensibilidade a insulina (AUGUET et al., 2011; HEIKER, 2014). Neste estudo encontramos uma diminuição na circulação de vaspina no grupo diabético, estes dados corroboram as pesquisas que mostram que a vaspina está diminuída em estados de hiperglicemia severa (HIDA et al., 2005). Wada (2008) mostraram que a administração de vaspina melhorou a sensibilidade à insulina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Hida et al. (2005) encontrou que a administração de vaspina em ratos promoveu uma melhoria na sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose, por outro lado, a utilização de insulina aumentou a expressão de RNA mensageiro de vaspina no tecido adiposo de ratos. Em sujeitos diabéticos, com um controle glicêmico adequado, os níveis de vaspina estavam mais baixos quando comparados com aqueles diabéticos, mas com inadequado controle glicêmico (GULCELIK et al., 2009). Assim, a relação de insulina no controle da glicemia pode estar envolvida na regulação da concentração sistêmica de vaspina, mas são necessários mais estudos para comprovar tal hipótese. No nosso modelo experimental parece que a inflamação e o quadro de resistência a insulina podem ter contribuído para uma diminuição da vaspina circulante nos ratos diabéticos, o que sugere que esta proteína pode contribuir para a construção do fenótipo do presente modelo de diabetes do tipo 2, nos estágios iniciais da doença.

A vaspina também pode estar relacionada com os níveis de soro de outras adipocitocinas importantes produzidas pelo tecido adiposo, tais como a adiponectina. Hida et al. (2005) mostraram que a administração vaspina aumenta a concentração de adiponectina.

Em nosso estudo tanto a concentração de vaspina e de adiponectina estavam reduzidas nos animais diabéticos o que mostra a importante relação entre adiponectina e vaspina no controle do diabetes tipo 2. A adiponectina, bem como a vaspina, está relacionada com o aumento da sensibilidade à insulina e redução da intolerância à glucose no diabetes (TRUJILLO; SCHERER, 2005), estando reduzida no caso de diabetes tipo 2, (OUCHI et al., 2011). Estudos têm demonstrado que a ação da adiponectina está intimamente relacionados com o seu efeito sobre a sensibilidade à insulina em animais diabéticos (SAAD; KAMEL; HANAFI, 2015) além de desempenhar um papel importante na inflamação (CAO, 2014). No entanto a sua influência exata ou sua relação com as adipocitocinas, como vaspina e omentina, em indivíduos obesos com diabetes tipo 2 são ainda pouco claras e mais pesquisas são necessárias para esclarecer esses fatos.

Os nossos resultados forneceram evidência da eficácia do modelo de diabetes induzidos com dieta hiperlipídica e baixas doses de STZ, comprovando que tanto o metabolismo do tecido adiposo e a secreção de adipocinas pode estar alterada em ratos diabéticos. A omentina não foi alterada nos estágios iniciais da doença, mas a vaspina foi responsiva ao diabetes. Outras investigações sobre as ligações moleculares entre vaspina e diabetes pode desvendar estratégias terapêuticas inovadoras na diabetes.

4.2 Capítulo 2: Os três protocolos de exercício em ratos não-diabéticos

Neste capítulo o objetivo principal é apresentar o efeito dos três diferentes protocolos de treinamento sobre a expressão da omentina e vaspina em ratos sem diabetes experimental tipo 2: estudo controle.

Resultados

Massa corporal e consumo alimentar

Na Tabela 4 observa-se que não há diferença significativa no consumo alimentar diário e ingestão calórica entre os grupos analisados. No entanto, a massa corporal final e ganho de massa corporal do grupo treinado resistido foi menor em comparação com o grupo controle (SN).

TABELA 04-Ganho de massa corporal e ingesta alimentar e calórica

	Massa corporal (Kg)			Consumo diário (g/dia)	Ingesta calórica (Kcal/dia)
	Inicial	Final	Ganho de Massa		
SN	0,191± 0,012	0,512± 0,015	0,333± 0,014	26,710 ±0,433	108,711±1,763
TRN	0,201± 0,009	0,466± 0,015 ^a	0,265± 0,007 ^a	25,690±0,431	104,558±1,752
TAN	0,202± 0,007	0,494± 0,015	0,293± 0,013	26,801±0,452	109,078±1,841
TCN	0,180± 0,012	0,468± 0,016	0,280± 0,017	25,076±0,411	102,058±1,673

SN. Sedentário não-diabético; TRN. Treinado Resistido não-diabético; TAN. Treinado Aeróbico não-diabético; TCN. Treinado Combinado não-diabético; São significativamente diferentes entre eles para $p < 0.05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN).

Variáveis do treinamento

As variáveis do treinamento são apresentadas na Tabela 5. A carga máxima de trabalho dos animais ao final de 10 semanas de treinamento foi maior em relação ao primeiro teste de carga máxima, mostrando a evolução da capacidade máxima de trabalho nos grupos submetidos ao treinamento resistido (TRN e TCN). Ao final do período experimental o grupo TRN apresentou maior carga máxima em relação ao grupo TCN. A velocidade atingida no Treino Aeróbico foi a mesma nos 2 grupos TAN e TCN.

TABELA 05- Variáveis do treinamento. Carga máxima e Velocidade máxima atingida.

	Carga Máxima Inicial (kg)	Carga Máxima Final (kg)	Velocidade Máxima (m/mim)
SN	-	-	-
TRN	0,359± 0,013	1,043± 0,036 ^e	-
TAN	-	-	20 ± 1,0
TCN	0,360± 0,016	0,922± 0,037 ^{bc}	20 ± 1,0

SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético, São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Teste - t de Student), ^a vs, SN; ^b vs, TRN; ^c vs, TAN; ^d vs, TCN, ^e inicial vs, final,

Frações lipídicas e ácido úrico

A Tabela 6 apresenta os valores de frações lipídicas e ácido úrico no soro. Os níveis de triglicerídeos foram reduzidos com os três protocolos de treino. Mas apenas os grupos TRN e TCN apresentaram diferença significativa em comparação com o grupo controle SN. O Colesterol total foi reduzido pelos treinos resistido e aeróbico mas com significância apenas para o TAN em comparação com o grupo SN. Em contrapartida, o grupo combinado obteve aumento no colesterol total e aumento também nos níveis de HDL em comparação com o grupo controle, o que, possivelmente, provocou o aumento no Colesterol total observado. Não houve diferença entre os grupos para as concentrações de ácido úrico.

TABELA 06- Colesterol total, Triglicerídeos e HDL colesterol (mg/dl).

	Triglicerídeos (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	Ácido Úrico (mg/dL)
SN	86,19± 9,60	45,35±3,04	33,83±1,56	1,66± 0,10
TRN	46,91±4,06 ^a	40,81±1,61	37,815±2,03	1,79± 0,11
TAN	60,00±7,75	33,21±1,56 ^a	38,55±1,71	1,94± 0,17
TCN	55,65±5,63 ^a	62,96±3,83 ^a	46,86±2,01 ^a	2,19± 0,20

SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético. São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni - test comparações múltiplas). ^a vs, SN; ^b vs, TRN; ^c vs, TAN; ^d vs, TCN.

Peso relativo dos tecidos

A Tabela 7 demonstra o peso relativo dos tecidos. Não observamos diferença estatística entre os grupos para peso relativo do fígado e do pâncreas. Nos depósitos de

gordura abdominal houve uma aparente redução com os protocolos de treinamento, mas não houve diferença significativa em RET, EPI e VIS.

TABELA 07- Peso relativo do pâncreas, fígado e depósitos de gordura abdominal

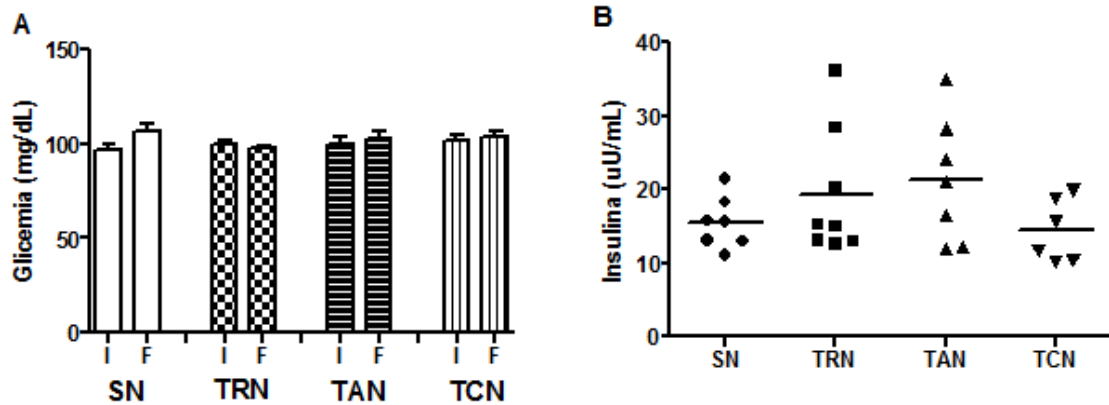
	Pâncreas (g/100g peso corporal)	Fígado (g/100g peso corporal)	Deposito de gordura abdominal (g/100g peso corporal)		
			EPI	RET	VIS
SN	0,17±0,01	2,72±0,05	1,83±0,19	1,63±0,19	1,46±0,13
TRN	0,20±0,01	2,52±0,05	1,63±0,19	1,51±0,17	1,29±0,17
TAN	0,18±0,01	2,83±0,05	1,43±0,08	1,48±0,08	1,10±0,06
TCN	0,18±0,01	2,65±0,06	1,36±0,09	1,35±0,09	1,12±0,09

EPI, tecido adiposo epididimal; RET tecido adiposo retroperitoneal; VIS tecido adiposo visceral, SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético; São significantemente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas).

Valores de glicemia e insulina

A glicemia inicial (SN, 101,66±1,28; TRN, 101,66±1,64; TAN, 95,33±1,72; TCN, 101,67±3,93 mg/gl) e final (SN, 104,00±4,06; TRN, 97,60±1,43; TAN, 103,20±3,81; TCN, 104,00±2,16 mg/gl) dos grupos não teve diferença estatística. Mas considerando a evolução de cada grupo, comparamos o valor da glicemia inicial e final (Figura 9A). Os valores de insulina também diferiram entre os grupos (SN, 15,49±1,33; TRN, 19,26±3,07; TAN, 21,34±3,22; TCN, 14,46±1,75) (Figura 9B).

Figura 9 - Comportamento da glicemia e insulina.



I, início do experimento; F, final do experimento, SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético; São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas).

Glicogênio

Os valores de glicogênio são apresentados na tabela 08. O glicogênio hepático foi maior em todos os grupos exercitados, com diferença estatística apenas para o grupo treinado aeróbico e o combinado quando comparados com o grupo controle SN. O glicogênio muscular teve comportamento similar entre os dois músculos analisados (gastrocnêmio e braquiorradial). Os 3 grupos treinados (TRN, TAN, TCN,) tiveram uma redução no estoque de glicogênio muscular em relação ao controle SN. O grupo TCN teve redução no estoque de glicogênio em relação aos grupos TRN e TAN.

TABELA 08- Glicogênio muscular e hepático,

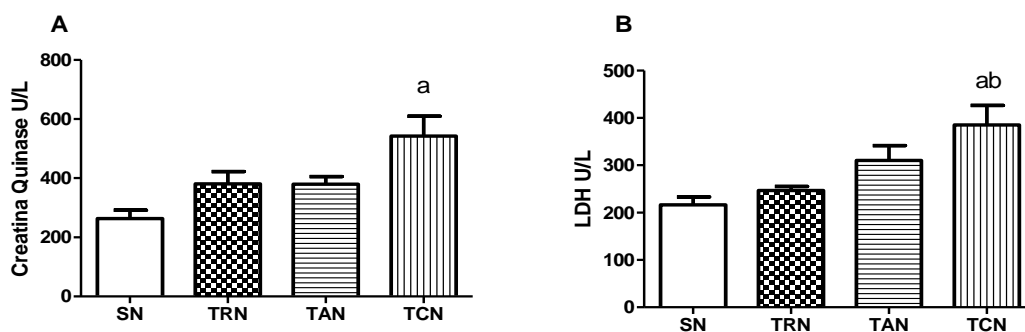
	Hepático ($\mu\text{mol}/100\text{g}$)	Gastrocnêmico ($\mu\text{mol}/100\text{g}$)	Braquiorradial ($\mu\text{mol}/100\text{g}$)
SN	$0,86 \pm 0,05$	$1,84 \pm 0,17$	$2,53 \pm 0,22$
TRN	$1,11 \pm 0,16$	$1,40 \pm 0,07^a$	$1,45 \pm 0,044^a$
TAN	$2,48 \pm 0,28^a$	$1,52 \pm 0,03^a$	$1,48 \pm 0,04^a$
TCN	$2,57 \pm 0,31^a$	$0,48 \pm 0,03^{abc}$	$0,47 \pm 0,08^{abc}$

SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético; São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas), ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Níveis séricos da Creatina quinase (CK), Lactato desidrogenase (LDH)

Os níveis séricos de CK foram significativamente maiores no grupo TCN ($542,51 \pm 67,39$) quando comparados ao grupo SN ($263,38 \pm 28,58$) (Figura 10A). O mesmo aconteceu com os níveis séricos de LDH, onde foi significativamente maior no TCD ($385,21 \pm 41,41$) quando comparados ao grupo controle SN ($216,58 \pm 16,66$), como mostra a Figura 10B.

FIGURA 10- Comportamento das enzimas Creatina quinase (CK), Lactato desidrogenase (LDH).



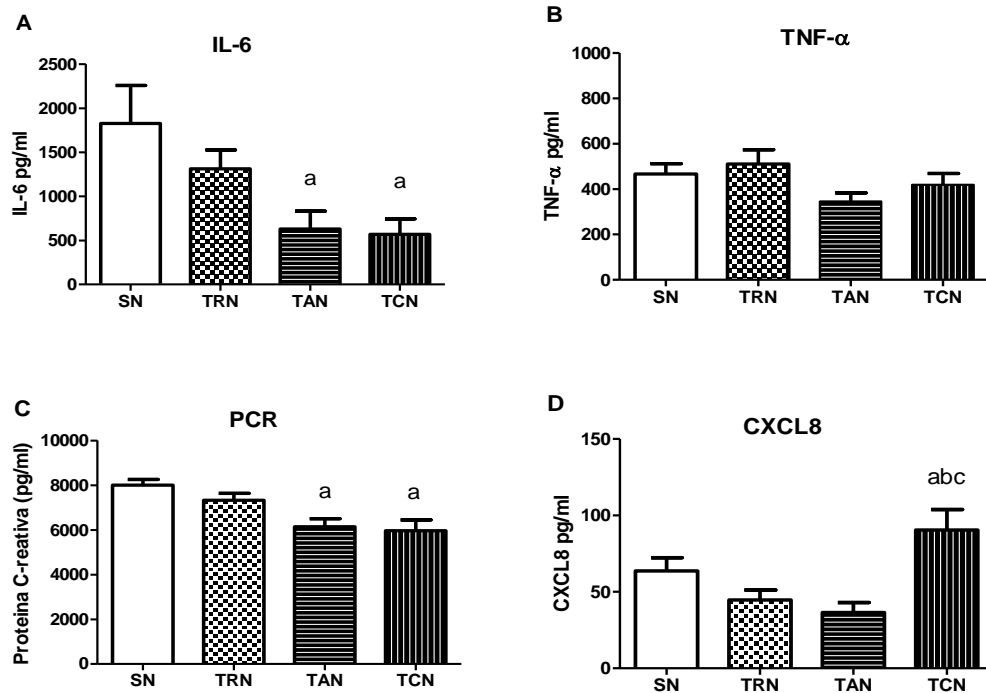
SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético; São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Citocinas séricas

Verificamos que os treinamentos resistido ($1311,25 \pm 214,05$), aeróbico ($629,87 \pm 203,27$) e combinado ($568,85 \pm 176,52$) reduziram a Interleucina 6 (IL-6) no soro comparando ao grupo controle SN ($1826,46 \pm 431,83$), mas apenas os grupos TAN e o TCN apresentaram diferença estatística (Figura 11A). Observamos também que os treinamentos não alteraram os níveis circulantes de Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (SN, $467,33 \pm 44,51$; TRN, $510,53 \pm 63,36$, TAN, $345,82 \pm 37,67$, TCN, $419,12 \pm 49,77$) (Figura 11B).

A proteína-C-reativa (PCR) foi reduzida no grupo TRN ($7325,84 \pm 308,53$), sendo que apresentou diferença estatística apenas o treinamento aeróbico ($6147,35 \pm 360,85$) e combinado ($5961,86 \pm 490,63$) em relação ao controle ($8007,83 \pm 255,51$) (Figura 11C). A quimiocina CXCL8 também conhecida como IL-8, não foi alterada com os treinamentos resistido ($44,67 \pm 6,46$) e aeróbico ($36,41 \pm 6,64$) em comparação com o grupo SN ($63,69 \pm 8,66$), mas o grupo combinado ($90,46 \pm 13,37$) obteve um aumento significativo comparado aos demais grupos (Figura 11D).

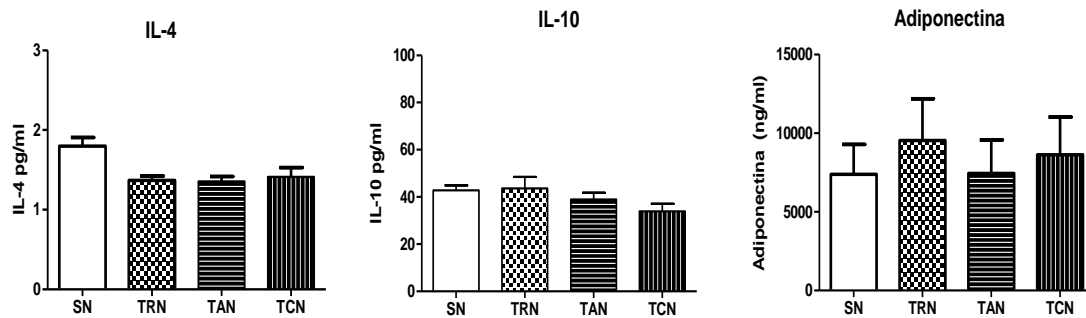
FIGURA 11 - Concentração de citocinas pró inflamatórias no soro.



SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético; São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

A concentração sérica de citocinas anti-inflamatórias interleucina 4 (SN, $1,799 \pm 0,106$; TRN, $1,506 \pm 0,146$; TAN, $1,355 \pm 0,061$; TCN, $1,411 \pm 0,118$). Interleucina 10 (SN, $42,76 \pm 2,20$; TRN, $43,58 \pm 4,89$; TAN, $38,93 \pm 2,87$; TCN, $33,85 \pm 3,29$) e Adiponectina (SN, $7382,09 \pm 1895,59$; TRN, $9531,46 \pm 2655,69$; TAN, $6693,88 \pm 2018,68$; TCN, $8510,95 \pm 2106,73$) não foram alteradas pelos protocolos de exercícios comparados ao grupo não treinado (SN) (Figura 12).

FIGURA 12- Concentração de citocinas anti-inflamatórias e adiponectina no soro,

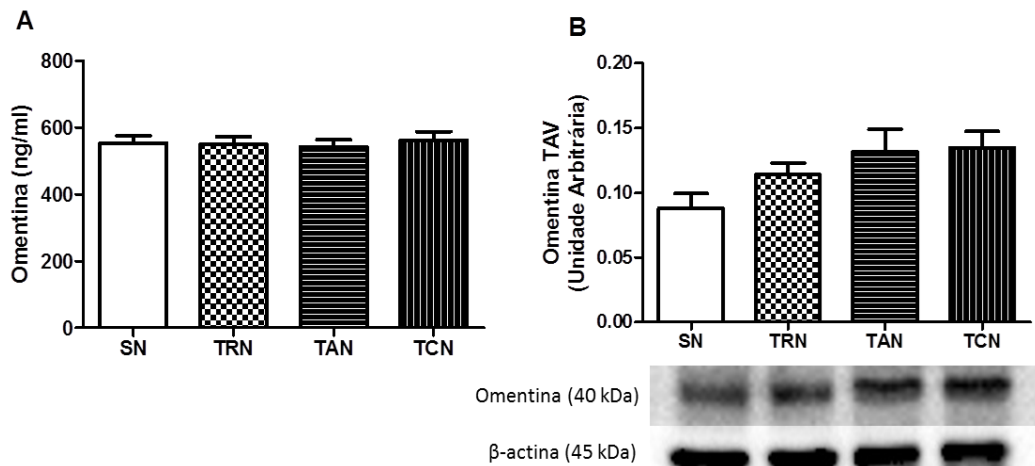


A, Interleucina 4; B, Interleucina 10; C Adiponectina, SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético. São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas).

Adipocinas: Omentina e Vaspina

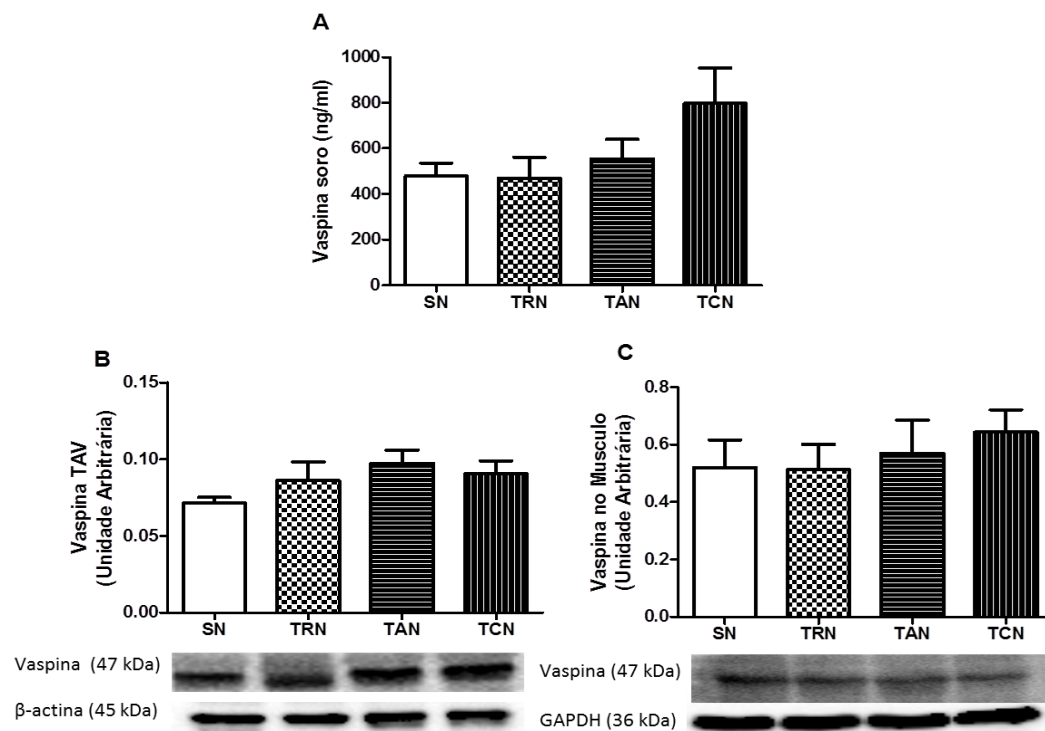
A concentração sistêmica de Omentina não foi alterada mediante as intervenções do treinamento (Figura 13A) (SN, $563,65 \pm 23,13$; TRN, $550,47 \pm 22,85$; TAN, $541,57 \pm 21,93$; TCN, $562,51 \pm 25,69$). No tecido adiposo visceral verificamos um aumento da concentração de omentina com os protocolos de treinamento (TRS, $0,114 \pm 0,008$; TAS, $0,132 \pm 0,017$; TCS, $0,135 \pm 0,012$), mas essas alterações não foram significativas em comparação com o controle (SN, $0,087 \pm 0,011$) (Figura 13B).

FIGURA 13 -Concentração de Omentina no soro (A) e Tecido adiposo visceral (B).



Western blot representativo do comportamento da omentina Tecido Adiposo Visceral (TAV), Omentina (40 kDa) no TAV frente aos protocolos experimentais, Resultados expressos em média \pm EP (n=6), SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético. São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

A expressão proteica de vaspina no tecido adiposo visceral não sofreu alteração mediante os protocolos de exercício (TRN, $0,086 \pm 0,012$; TAN, $0,097 \pm 0,008$; TCN, $0,090 \pm 0,008$) comparados ao controle ($0,071 \pm 0,003$) (Figura 14B). O mesmo aconteceu com os valores de vaspina circulante os quais não foram alterados pelos exercícios (TRN, $470,52 \pm 90,86$; TAN, $553,98 \pm 86,15$; TCN, $796,63 \pm 155,89$) em comparação com o controle SN ($478,51 \pm 57,26$) (Figura 14A). O mesmo aconteceu com a vaspina no musculo que não teve diferença com os treinamentos (TRS, $0,512 \pm 0,08$; TAS, $0,56 \pm 0,11$; TCS, $0,64 \pm 0,078$) comparados ao grupo SN ($0,520 \pm 0,09$) (Figura 14C).

FIGURA 14 - Expressão proteica da Vaspina.

A, Valores de Vaspina no soro (ELISA, n=8), B, Western blot representativo do comportamento da Vaspina no Tecido Adiposo Visceral; C, Vaspina (40 kDa) no musculo (n=6). Resultados expressos em media \pm SEM, SN, Sedentário não-diabético; TRN, Treinado Resistido não-diabético; TAN, Treinado Aeróbico não-diabético; TCN, Treinado Combinado não-diabético; São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Discussão

Neste estudo encontramos que as concentrações de omentina e vaspina não foram alteradas pelos protocolos de treinamento, resistido, aeróbico e combinado em ratos *Wistar* eutróficos, mesmo com as melhoras específicas no perfil lipídico e na inflamação.

Diversos estudos têm reportado que o exercício promove redução na massa corporal, adiposidade, inflamação e dislipidemias em ratos (DUARTE et al., 2008; ESTADELLA et al., 2004; MIYAZAKI et al., 2010; SENE-FIORESE et al., 2008) na tentativa de reduzir os efeitos adversos do sedentarismo. Entretanto, sabe-se que a intensidade, frequência e duração do exercício, bem como o tipo de dieta têm promovido diferentes adaptações metabólicas (HOROWITZ, 2003). O que tem sido questionado é a eficácia de diferentes protocolos de exercício e se estes têm os mesmos efeitos benéficos sobre a adiposidade visceral, perfil lipídico, inflamação e modulação das adipocinas.

Neste contexto, os três protocolos de treinamento realizados neste estudo, foram eficazes em melhorar o perfil lipídico dos animais sem provocar grandes alterações na massa corporal e no peso relativo dos depósitos de gordura abdominal. Apenas o exercício resistido de alta intensidade reduziu de maneira significativa a massa corporal, além disso, reduziu significativamente os níveis de TG (45%), provocou uma redução sem diferença estatística, mas biologicamente importante de 10% no colesterol total-CT e de 12 % de aumento no HDL-c. Há poucos trabalhos científicos experimentais relacionados com alterações de lipoproteínas e treinamento Resistido de alta intensidade, mas seus efeitos podem estimular o funcionamento dos processos enzimáticos envolvidos no metabolismo lipídico como o aumento da lipoproteína lipase e lecitina-colesterol-acil-transferase (SCHRAUWEN; WESTERTERP, 2000). Em estudo prévio foi observado que este mesmo protocolo de exercício em escada por 8 semanas promoveu redução no TG, CT e aumento do HDL tanto em ratos alimentados com dieta hiperlipídica quanto em animais eutróficos (SPERETTA et al., 2012). Em contrapartida, o mesmo grupo em outro estudo mostrou que o protocolo de treino Resistido, agora por 10 semanas, não provocou alterações nos níveis de TG e HDL (SPERETTA et al., 2016), De acordo com Leite et al, (2009), o exercício resistido em escada não altera os níveis de CT, mas reduz o TG e aumenta o HDL. Os diferentes resultados encontrados na literatura, que permeiam o protocolo de treinamento resistido, demonstram que os resultados podem alterar conforme a intensidade e volume aplicados ao treinamento. Ainda neste contexto, observamos que o treinamento Aeróbico reduziu em 30% os níveis de TG circulantes, 26% o CT e aumentou 14% o HDL, sendo que apenas a redução do CT foi estatisticamente significativa. Vários estudos relatam melhora do perfil lipídico como diminuição nos níveis TG, CT e aumento do HDL após o treinamento aeróbico (MARQUES et al., 2010; TOUATI et al., 2011). No entanto, em um estudo de revisão da literatura, os autores sugerem que o exercício físico aeróbico regular tem demonstrado promover aumento do HDL, com manutenção e/ou aumento do colesterol LDL e triglicerídeos (MANN; BEEDIE; JIMENEZ, 2014). Nossos dados sugerem a eficácia dos treinamentos Resistido e Aeróbico moderado em controlar e melhorar o perfil lipídico, uma vez que pequenas reduções já são consideradas mudanças biologicamente efetivas. Em contrapartida, existe uma literatura limitada que examina estas duas modalidades combinadas, considerando que esta conjunção pode complementar, e possivelmente, aumentar os efeitos sobre o perfil lipídico.

Diante disso testamos o exercício combinado e verificamos que grupo TCN, reduziu os níveis de TG em 35%, mas aumentou o CT em 38%, sendo que este aumento pode

ter sido em função do expressivo aumento do HDL (38%). Tambalis et al, (2009) sugeriram em uma revisão que, embora alguns protocolos de combinação tenham sido eficazes na redução do colesterol LDL e aumentar o colesterol HDL, outros não têm apresentado efeito. No geral, os dados sugerem uma relação dose-resposta entre o aumento na atividade física e melhorias nos triglicerídeos, colesterol total e HDL, mostrando a importância do exercício crônico no controle das dislipidemias em animais e humanos já que a redução do colesterol total é considerada padrão ouro na prevenção de doenças cardiovasculares (MANN; BEEDIE; JIMENEZ, 2014). Entretanto, os mecanismos subjacentes ao efeito do exercício sobre o perfil lipídico não são claros, mas especula-se que o exercício aumente a capacidade do músculo esquelético em utilizar os lipídeos em oposição ao glicogênio, reduzindo assim os níveis de lipídeos séricos (EARNEST et al., 2013). Outra possibilidade é a capacidade de modulação de enzimas envolvidas no processo de metabolismo lipídico como a lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), aumentos na atividade da lipoproteína lipase e do gasto energético provido pelo exercício (HARRISON et al., 2012; SCHRAUWEN; WESTERTERP, 2000). Dessa forma é importante considerar o tipo, frequência, intensidade e duração do exercício para melhorias nos no perfil lipídico (MANN; BEEDIE; JIMENEZ, 2014).

Além das alterações no perfil lipídico provocadas pelos protocolos estudados, encontramos também alterações importantes no estado inflamatório. Sabe-se que o exercício pode influenciar os níveis sistêmicos de citocinas pró e anti-inflamatórias, agindo como um fator protetor para diversas doenças melhorando a sensibilidade à insulina (BALDUCCI et al., 2010; HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; MIYAZAKI et al., 2010), independente da perda de massa corporal (BALDUCCI et al., 2010). Os marcadores inflamatórios foram reduzidos de forma geral em resposta a todos os protocolos utilizados. A IL-6 foi reduzida com o treinamento de resistido em 28%, em 65% com o treinamento aeróbico e 68% com o combinado. Outro marcador inflamatório importante é a proteína C reativa que está envolvida na resposta inflamatória de fase aguda. Vale ressaltar que esta citocina também foi reduzida pelos protocolos de treinamento propostos neste estudo (TRN, 8%; TAN, 23%; TCN, 25%) sendo que, apenas o TAN e o TCN tiveram redução significativa, A citocina inflamatória TNF- α não apresentou diferença estatística, apesar de ter uma leve redução principalmente com o treino aeróbico. As citocinas fator de necrose tumoral (TNF) - α , interleucina (IL) -6 e IL-8 desempenham papéis importantes na sinalização patológica e adaptações fisiológicas ao exercício (LANDERS-RAMOS et al., 2014). Os resultados sobre o papel de modulação do exercício na inflamação ainda não são consistentes. Estudos mostram que o exercício pode

não ter relação direta com a concentração de citocinas séricas em indivíduos com treinamento de resistência em comparação com sedentários (SCOTT et al., 2011). Já outros estudos têm associado o treinamento de “endurance regular” com baixos níveis de marcadores inflamatórios (GOKHALE; CHANDRASHEKARA; VASANTHAKUMAR, 2007; GOMES; SILVA; DE OLIVEIRA, 2012; LANDERS-RAMOS et al., 2014; VASSILAKOPOULOS et al., 2003). Nossos resultados corroboram que estes achados onde os níveis de marcadores inflamatórios PCR e IL-6 foram menores com os protocolos de exercício, principalmente o Aeróbico e Combinado.

A Proteína C reativa pode ser alterada por diversos fatores uma vez que esta proteína atua como proteína de fase aguda, produzida no fígado (KOENIG; KHUSEYINOVA, 2007). Corroborando com nossos achados, Figueiredo Braggion et al, (2016) encontraram que o exercício resistido em ratas ovariectomizadas não alterou a proteína C reativa circulante, e de Lemos et al, (2007) mostraram redução nos níveis de PCR perante o exercício aeróbico (natação) de baixa intensidade. Esta proteína pode ser modulada em resposta à citocinas, como a IL-6, já que sua síntese ocorre sob estímulo primário da interleucina-6 (IL-6) nos hepatócitos, apresentando traços normalmente detectados no sangue (KOENIG; KHUSEYINOVA, 2007). As concentrações de PCR podem ter sido reduzidas significativamente nos treinos Aeróbico e combinado devido a redução significativa da IL-6. A literatura mostra que pequenas alterações nos níveis de PCR no sangue é um forte indicador de inflamação uma vez que, tem papel direto na indução de componentes inflamatórios como moléculas de adesão e interleucinas (BERMUDEZ et al., 2002). Assim, mesmo reduções não significativas já apresentam resultados biológicos importantes para o indivíduo.

A modulação da IL-6 circulante também é controversa perante o exercício Gleeson (2007), não encontraram aumentos significativos nos níveis de IL-6 em ratos após treinamento intenso na esteira, com duração de sete semanas. Já outros trabalhos relacionam altos níveis de IL-6 na circulação após o exercício (GOKHALE; CHANDRASHEKARA; VASANTHAKUMAR, 2007; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2007). A IL-6 tem uma vasta gama de propriedades biológicas incluindo angiogênese e remodelação vascular, bem como a regulação da homeostase glicemia e a oxidação das gorduras (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2007). Estas diferentes ações da IL-6 podem ser devido a suas diferentes funções nos órgãos (fígado, músculo) ou suas diferentes fontes (músculo, gordura), sendo que uma parte considerável de IL-6 circulante é proveniente do tecido adiposo (OUCHI et al., 2011), assumindo assim, sua função pró-inflamatória, sendo benéfica sua redução com o exercício crônico.

A citocina quimiotática chamada de CXCL8 (IL8) foi aumentada no grupo TCN em 41%. Este fato pode ter ocorrido uma vez que, este tipo de treinamento pode ter provocado um estresse muscular local, já que houve um aumento significativo nos valores de CK e LDH circulantes desse grupo. No entanto, os outros marcadores inflamatórios foram reduzidos neste grupo como IL-6, TNF- α , PCR. É importante salientar que esta redução nas citocinas pró-inflamatórias foram acompanhadas com manutenção do sistema anti-inflamatório, não provocando depressão de IL-10, IL-4 e adiponectina. Diante disso podemos especular que o exercício combinado pode ter um estímulo local de inflamação e não um estímulo sistêmico. Estudos mostram que o aumento da IL-8 pode ser em resposta a exercício exaustivo com componentes excêntricos e concêntricos (NIEMAN et al., 2012; OSTROWSKI et al., 1998). A IL-8 é uma quimiocina importante uma vez que, pode promover a angiogênese em células endoteliais microvasculares (HEIDEMANN et al., 2003), e podem contribuir para aumentos na capilarização do músculo esquelético induzidas pelo exercício (HEIDEMANN et al., 2003; NIEMAN et al., 2012; PEDERSEN et al., 2007). É possível que estes resultados sejam indicativos de um estímulo angiogênico reforçado com o exercício combinado, confirmando os achados de Landers-Ramos et al, (2014), que coloca a hipótese que a IL-8 poderia desempenhar um papel na angiogênese induzida por exercício. Assim apesar dos mecanismos de sinalização para a modulação de citocinas durante o exercício ainda não estarem claros, mas estudos mostram que a elevação das catecolaminas, danos musculares e deficiência de glicogênio estão envolvidos (NIEMAN et al., 2006). Cada um destes mecanismos propostos tem alguma ligação com a intensidade do exercício, e observamos isso no grupo TCN que apresentou uma redução de glicogênio muscular e aumento da CK e LDH. Mas é importante salientar que este estresse pode ter sido pequeno por ter reduzido as citocinas inflamatórias IL-6 e PCR corroborando com os dados de Nieman et al, (2012), além de não ter reduzido as citocinas anti-inflamatórias circulantes (IL-4, IL-10) e a adiponectina.

Além das citocinas circulantes as adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, também têm atividade pró e anti-inflamatórias, além de função hormonal e de atuar no metabolismo. A expressão desregulada dessas adipocinas, causadas pelo excesso de adiposidade, e disfunção do adipócito na obesidade, tem sido relacionada à patogênese de diversas doenças por meio de respostas imunes alteradas (OUCHI et al., 2011). As mudanças no perfil de adipocinas conforme a quantidade e a condição do tecido adiposo levam a distúrbios metabólicos que desempenham papel central no desenvolvimento de resistência à

insulina, DM2 e aumento no risco de doenças cardiovasculares característicos da obesidade (LEAL; MAFRA, 2013).

A Omentina e Vaspina são adipocinas produzidas pelo tecido adiposo visceral, e são diferentemente expressas em indivíduos normais e com síndrome metabólica, diabetes e obesidade (HIDA et al., 2005). Os níveis circulantes destas duas adipocinas estão relacionadas a inflamação, sendo que a omentina está menos expressa em indivíduos obesos e diabéticos e a vaspina está mais expressa nestas condições. Estas duas adipocinas estão sendo consideradas biomarcadores de condições patológicas relacionadas a resistência a insulina. Estudos mostram que o exercício pode alterar as concentrações de adipocinas em indivíduos obesos e diabéticos na tentativa de melhorar estados patológicos, mas pouco se tem sobre estas das adipocinas frente ao exercício em condições normais.

No nosso estudo com ratos eutróficos os treinamentos, resistido, aeróbico e combinado não foram capazes de provocar alterações nos níveis circulantes de Omentina, e no Tecido adiposo visceral, mesmo provocando aumentos percentuais importantes (TRN, 31%; TAN, 51%; TCN, 55%). Podemos hipotetizar, frente a estes resultados, que a falta de aumento na Omentina seja uma das razões da manutenção do estado metabólico normal nesses animais eutróficos, uma vez que suas alterações metabólicas ligadas a sensibilidade a insulina não sofreram alterações com o exercício, já que são indivíduos com parâmetros estáveis. Corroborando com nossos dados, Rahimlou et al, (2015) não encontrou qualquer correlação significativa entre níveis de omentina com parâmetros da composições metabólicas e corporais, tais como triglicérides, colesterol total, HDL, percentual de gordura e massa livre de gordura. Estudos mostram que a omentina tem um papel anti-inflamatório importante (ZABETIAN-TARGHI et al., 2016), mas mesmo com alterações significativas na inflamação estas não foram alteradas em nosso estudo.

Os níveis séricos de vaspina não foram significativamente alterados mesmo no grupo TCN, apresentando uma elevação de 66%. O mesmo ocorreu com as concentrações de vaspina no tecido adiposo mesentérico e muscular onde os protocolos utilizados não provocaram alterações significativas. Youn et al, (2008) relataram que o treinamento físico, durante 4 semanas, resultou em níveis significativamente aumentados de vaspina em indivíduos com níveis normais de tolerância a glicose. Alterações nos níveis de vaspina soro foram significativamente correlacionados com as mudanças no pico de consumo de oxigênio onde exercícios estressantes podem diminuir as concentrações de vaspina. Dimova & Tankova (2015) coloca que a diminuição dos níveis de vaspina no soro pode ser um mecanismo de ajustamento, em resposta à melhoria na sensibilização da insulina e diminuição

dos níveis de marcadores inflamatórios em ratos treinados, mas coloca ainda que as concentrações séricas de vaspina são menores em indivíduos magros, mas aumentou com a perda de massa corporal associada com um programa de treinamento físico.

Além disso, vários fatores decorrentes da realização de exercícios podem ser responsáveis por esta discordância dos resultados, uma vez que podemos especular que o exercício, realizado 3 vezes por semana em indivíduos estróficos seja pouco para provocar alterações nas adipocinas circulantes. Simpson & Singh (2008) concluíram que o exercício pode alterar as concentrações de adiponectina em indivíduos normais, mas este aumento depende de volume de exercício, frequência e intensidade. Dessa forma, mais estudos são necessários para verificar a relação do exercício e modulação destas adipocinas, uma vez que estas estão envolvidas na inflamação crônica subclínica induzindo alterações metabólicas importantes nos indivíduos (ALISSA et al., 2016).

Assim, concluímos que os três tipos de protocolos de exercício propostos neste estudo, apesar de não terem provocado alterações significativas nas concentrações de omentina e vaspina, foram benéficos a ponto de provocar alterações importantes no perfil lipídico e inflamatório de ratos eutróficos. Sendo que, o exercício aeróbico e combinado tiveram redução mais consistente, sugerindo que estes podem ser um aliado importante na prevenção de doenças associadas com baixo grau de inflamação. Neste sentido, embora a literatura seja limitada em estudos que compare os três modelos de exercício, tão pouco o combinado, é necessário considerar os efeitos fisiológicos adicionais e sistêmicos, que podem impactar na prevenção de doenças metabólicas como a obesidade e diabetes.

4.3 Capítulo 3: Os três protocolos de exercício em ratos diabéticos

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados referentes ao efeito dos três treinamentos sobre a expressão da omentina e vaspina em ratos com diabetes tipo 2 experimental.

Resultados

Peso corporal e consumo alimentar

Na Tabela 09, observa-se que não há diferença significativa no peso corporal inicial, final e ganho de massa entre os grupos, apesar de observar que o grupo controle SD teve uma porcentagem (51%) maior de ganho de massa corporal que os animais submetidos ao exercício (TRD, 49 %; TAD, 46%; TCD, 47%). O consumo diário e a ingesta calórica também não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

TABELA 09 - Ganho de massa corporal e ingesta alimentar e calórica.

	Massa corporal (Kg)			Consumo diário (g/dia)	Ingesta calórica (Kcal/dia)
	Inicial	Final	Ganho		
SD	0,207± 0,012	0,415± 0,016	0,212± 0,011	27,984±0,864	112,204± 1,811
TRD	0,211± 0,007	0,417± 0,015	0,206± 0,019	27,172±1,012	110,588± 1,431
TAD	0,207± 0,006	0,384± 0,011	0,178± 0,007	27,178±1,060	110,094± 1,906
TCD	0,203± 0,009	0,383± 0,017	0,183± 0,015	27,023± 1,007	110,301± 3,360

SD, sedentário diabético; TRD, Treinado Resistido diabético; TAD, Treinado Aeróbico diabético; TCD, Treinado Combinado diabético; (n=10). São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Teste de carga máxima

As variáveis do treinamento são apresentadas na Tabela 10. A carga máxima de trabalho dos animais no final de 10 semanas de treino foi maior em relação ao primeiro teste de carga máxima inicial, mostrando a evolução da capacidade máxima de trabalho nos grupos com treino resistido (TRD e TCD) aumentando ao longo o período de treinamento (Tabela 10). Mas não houve diferença entre os grupos TRD e TCD para a carga máxima final. A velocidade atingida no Treino Aeróbico foi a mesma nos 2 grupos TAD e TCD.

TABELA 10 - Variáveis do treinamento, Carga máxima e Velocidade máxima atingida.

	Carga Máxima Inicial (kg)	Carga Máxima Final (kg)	Velocidade Máxima (m/mim)
SD	-	-	-
TRD	0,406± 0,027	0,940± 0,024 ^e	-
TAD	-	-	20m/mim
TCD	0,381± 0,052	0,826± 0,047 ^e	20m/mim

SD, Sedentário diabético; TRD, Treinado Resistido diabético; TAD, Treinado Aeróbico diabético; TCD, Treinado Combinado diabético; (Teste - t de Student). São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$. ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN. ^e inicial vs, final.

Frações lipídicas e ácido úrico

A Tabela 11 apresenta os valores de frações lipídicas e ácido úrico no soro. O grupo TRD teve redução dos níveis de Triglicerídeos e Colesterol Total comparado aos demais grupos. O exercício combinado (TCD) reduziu as concentrações de HDL-c, comparado ao SD e não houve diferença entre os grupos para as concentrações de ácido úrico.

TABELA 11- Colesterol total, Triglicerídeos e HDL colesterol (mg/dl).

	Triglicerídeos (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	Acido Úrico (mg/dL)
SD	224,85±29,90	85,84±7,77	48,97±1,92	1,98± 0,31
TRD	84,98 ± 7,30 ^{acd}	56,86±2,17 ^a	41,94±1,79	2,00± 0,26
TAD	218,12±16,82	76,26±4,77	43,28±1,77	2,10± 0,19
TCD	207,73± 17,78	68,01±3,64	40,381±2,15 ^a	2,05± 0,10

SD, Sedentário diabético(n=10); TRD, Treinado Resistido diabético(n=10); TAD, Treinado Aeróbico diabético(n=10); TCD, Treinado Combinado diabético (n=10). São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Peso relativo dos tecidos

De acordo com a Tabela 12, o peso relativo do fígado e pâncreas não foi alterado durante o experimento. Considerando os depósitos de gordura, a gordura Epididimal (EPI) não sofreu alteração com o exercício, em contrapartida a do peso da gordura Retroperitoneal (RET) diminuiu nos grupos TCD e TAD comparados ao SD. Já a gordura Visceral (VIS) foi reduzida apenas no grupo aeróbico (TAD) comparado ao controle SD.

TABELA 12- Peso relativo dos tecidos EPI, RET, VIS, Pâncreas e Fígado (g/100g peso corporal).

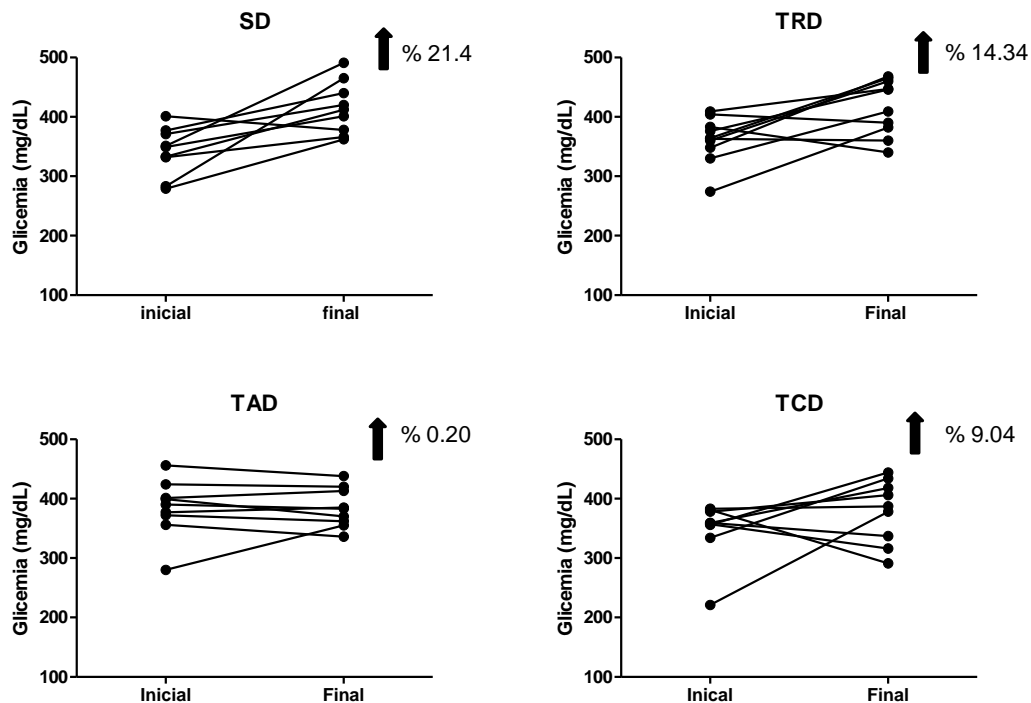
	Pâncreas	Fígado	Deposito de gordura abdominal		
			EPI	RET	VIS
SD	0,16±0,01	3,33±0,06	1,70±0,16	1,72±0,26	0,86±0,09
TRD	0,19±0,01	3,23±0,05	1,53±0,15	1,35±0,14	0,82±0,08
TAD	0,19±0,01	3,29±0,06	1,40±0,16	1,02±0,11 ^a	0,59±0,05 ^a
TCD	0,16±0,01	3,23±0,06	1,32±0,16	0,82±0,10 ^a	0,61±0,05

EPI, tecido adiposo epididimal; RET tecido adiposo retroperitoneal; VIS tecido adiposo visceral, SD, Sedentário diabético(n=10); TRD, Treinado Resistido diabético(n=10); TAD, Treinado Aeróbico diabético(n=10); TCD, Treinado Combinado diabético (n=10). São significativamente diferentes entre eles para p< 0,05 (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Glicemia

A glicemia final dos grupos não teve diferença estatística (SD, 415±14,77; TRD, 416±14,79; TAD, 384±11,10; TDC, 379±17,88 mg/gl), mas considerando a evolução de cada grupo, comparamos o valor da glicemia inicial (antes de iniciar os protocolos de treinamento) e final (Figura 15). O grupo controle teve um aumento em 21% na glicemia, já o grupo TRD teve 14% de aumento, o grupo combinado TCD teve 9 % e o grupo TAD teve menos que 1 %.

FIGURA 15- Comportamento da glicemia no início e no final do treinamento.

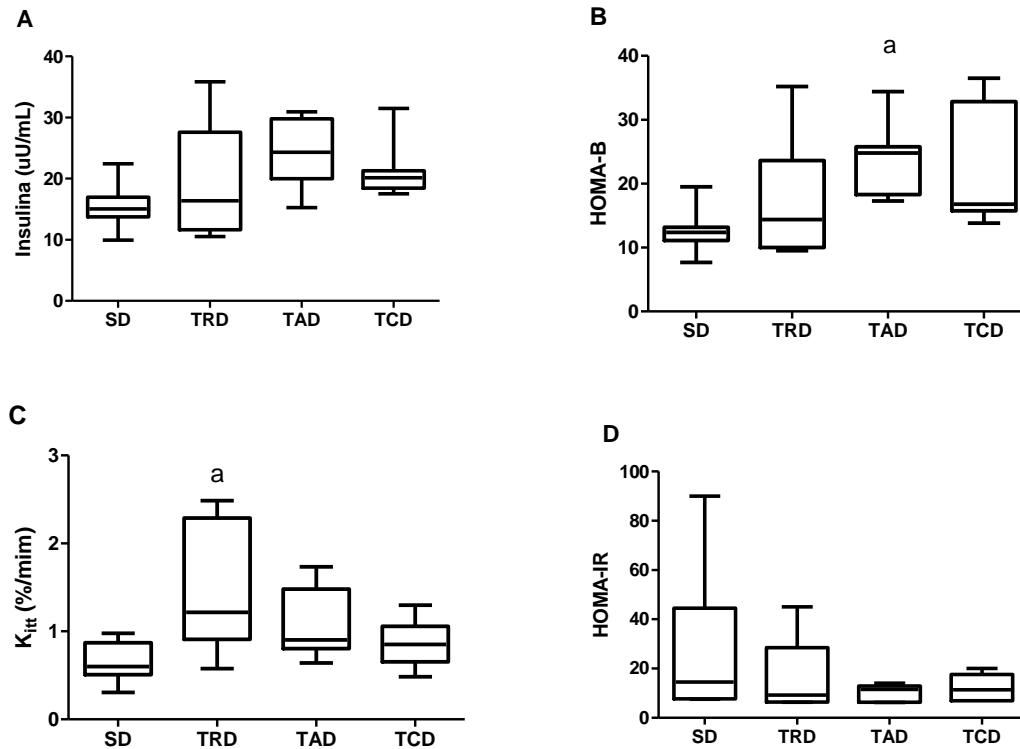


SD, Sedentário diabético(n=10); TRD, Treinado Resistido diabético(n=10); TAD, Treinado Aeróbico diabético(n=10); TCD, Treinado Combinado diabético (n=10). São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$.

Concentração de insulina

A concentração de insulina não foi alterada pelos treinamentos (Figura 16A). No entanto no teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTI), verifica-se que ocorre um aumento da constante Kitt no grupo TRD em comparação com o controle SD (Figura 16C). Não foi observado diferença estatística no HOMA-IR apesar de observar uma redução nos grupos com exercício (Figura 16D), já no HOMA- β que estima a função das células Beta este foi maior no grupo TAD (Figura 16B).

FIGURA 16-Teste de tolerância à insulina (ITT), Insulina, índice HOMA (*homeostatic model assessment*), função da célula beta (HOMA-β).

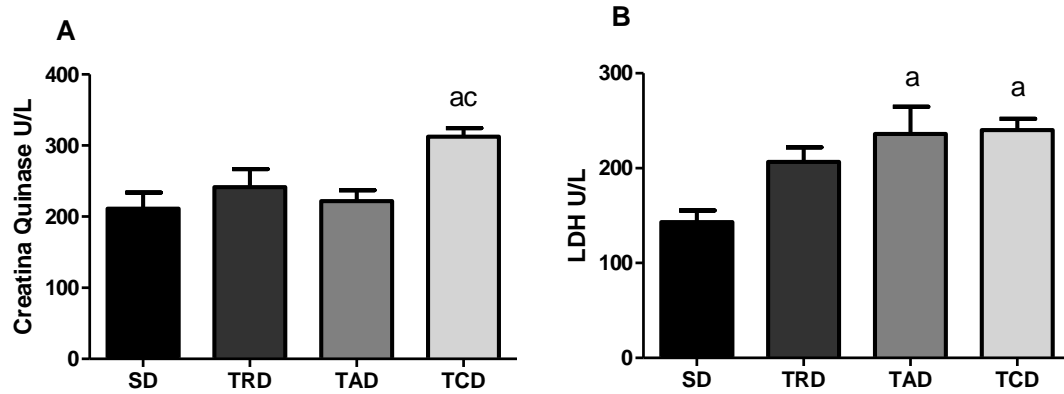


SD, Sedentário diabético(n=10); TRD, Treinado Resistido diabético(n=10); TAD, Treinado Aeróbico diabético(n=10); TCD, Treinado Combinado diabético (n=10). São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Níveis séricos da Creatina quinase (CK), Lactato desidrogenase (LDH)

Os níveis séricos de CK foram significativamente maiores no grupo TCD ($312,62 \pm 11,96$) quando comparados ao grupo SD ($211,14 \pm 22,64$) (Figura 17A). Já os níveis séricos de LDH foram significativamente maiores nos grupos TAD ($249,66 \pm 249,66$) e TCD ($240,23 \pm 11,878$) quando comparados ao grupo controle SD ($143,10 \pm 12,39$), como mostra a Figura 17B.

FIGURA 17 - Comportamento das enzimas Creatina quinase (CK), Lactato desidrogenase (LDH).



SD, Sedentário diabético(n=10); TRD, Treinado Resistido diabético(n=10); TAD, Treinado Aeróbico diabético(n=10); TCD, Treinado Combinado diabético (n=10). São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Glicogênio muscular e hepático

Considerando os valores de glicogênio apresentados na tabela 13, apenas o grupo Treinamento Resistido apresentou um aumento no conteúdo de glicogênio hepático e do musculo gastrocnêmio quando comparado com o grupo SD (Tabela 13). Mas o glicogênio no músculo do antebraço o Braquioradial, foi maior no grupo TAD e TCD comparado ao controle SD.

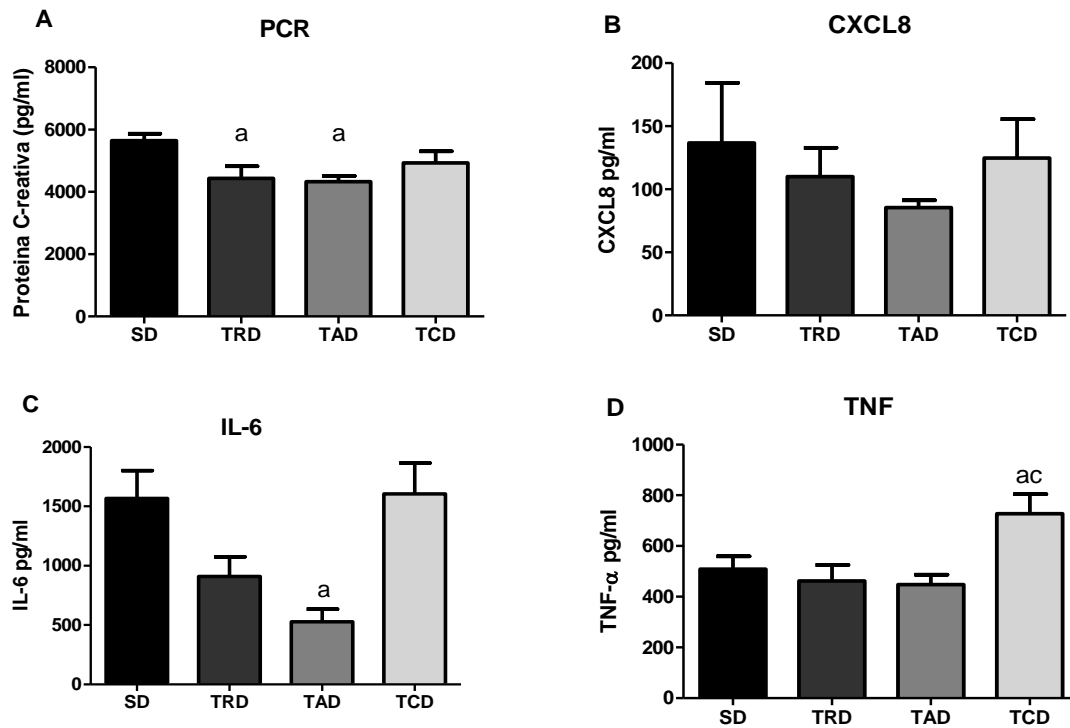
TABELA 13- Glicogênio muscular e hepático.

	Hepático (umol/100g)	Gastrocnêmio (umol/100g)	Braquiorradial (umol/100g)
SD	1,03 ± 0,12	0,52 ± 0,02	0,45 ± 0,02
TRD	1,78 ± 0,21 ^{ad}	1,17 ± 0,10 ^{acd}	0,59 ± 0,05
TAD	1,05 ± 0,05	0,56 ± 0,03	0,70 ± 0,04 ^a
TCD	1,23 ± 0,10	0,45 ± 0,02	0,65 ± 0,03 ^a

SD, Sedentário diabético(n=10); TRD, Treinado Resistido diabético(n=10); TAD, Treinado Aeróbico diabético(n=10); TCD, Treinado Combinado diabético (n=10). São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

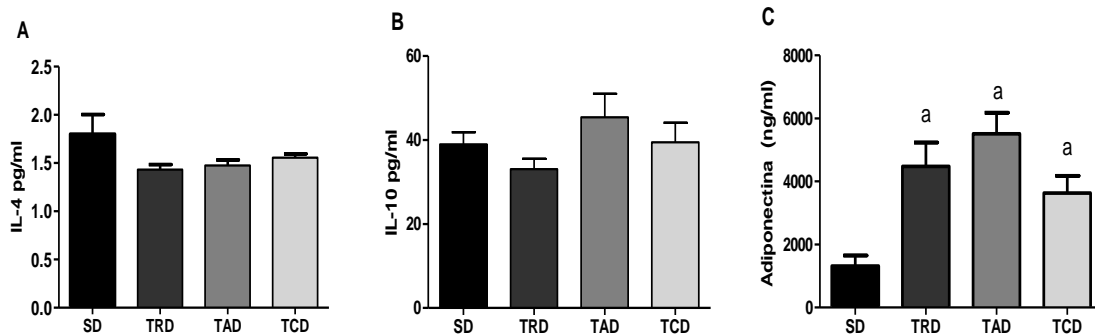
Citocinas séricas

A figura 18 mostra o comportamento das citocinas pró inflamatórias no soro. A proteína-C-reativa (PCR) foi reduzida com os três protocolos de exercício, porem apenas o TAD e o TCD apresentaram diferença estatística comparado ao controle SD (Figura 18A). A quimiocina CXCL8 também conhecida como IL-8 não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 4B). A Interleucina 6 (IL-6) foi significativamente reduzida pelo Exercício aeróbico (TAD) em comparação com o SD (Figura 4C). O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) não foi alterado nos grupos TRD e TAD, em contrapartida o grupo TCD elevou significativamente o TNF em relação ao grupo SD (Figura 18D).

FIGURA 18 - Concentração de citocinas pró inflamatórias no soro.

SD, Sedentário diabético (n=8); TRD, Treinado Resistido diabético(n=8); TAD, Treinado Aeróbico diabético(n=8); TCD, Treinado Combinado diabético (n=8). São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

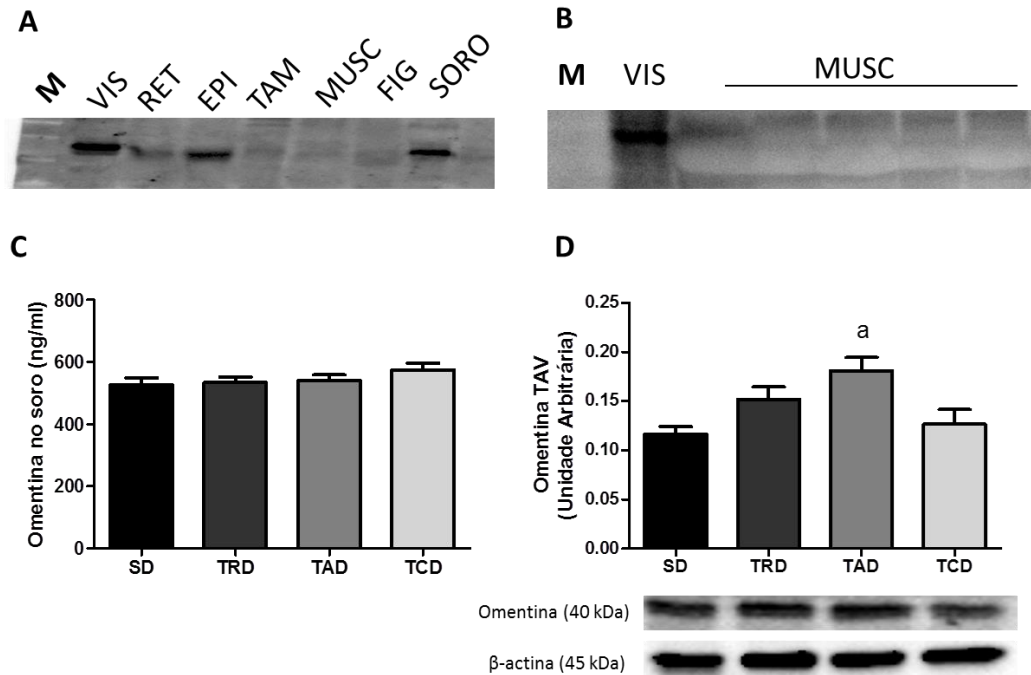
A interleucina 4 (Figura 19A) e Interleucina 10 (Figura 19B) não foram alteradas pelos protocolos de exercícios. Já a Adiponectina foi significativamente maior nos três grupos exercitados, TRD, TAD e TCD comparados ao grupo não treinado (Figura 19C).

FIGURA 19 - Concentração de citocinas anti-inflamatórias e adiponectina no soro.

SD, Sedentário diabético (n=8); TRD, Treinado Resistido diabético(n=8); TAD, Treinado Aeróbico diabético(n=8); TCD, Treinado Combinado diabético (n=8). São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Adipocinas: omentina e vaspina

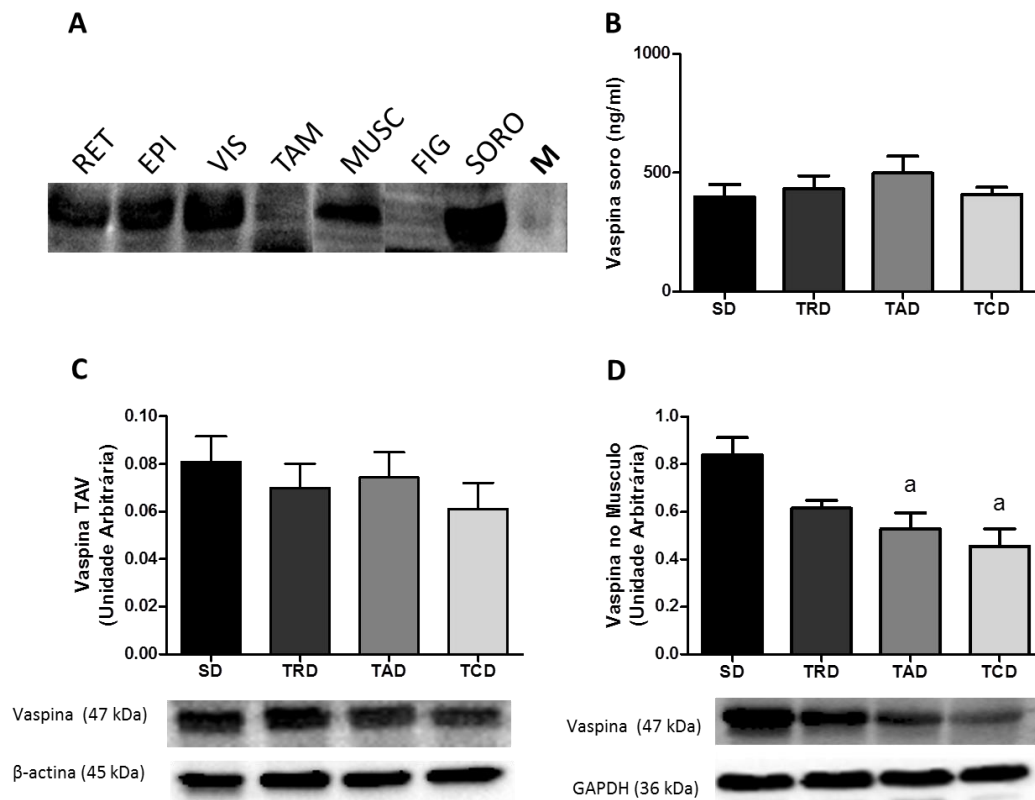
A análise de western blot de múltiplos tecidos (Figura 20A) indicou que a omentina é altamente expressa no tecido adiposo visceral (VIS) e que também está presente no soro e pouco menos expressa no tecido adiposo epididimal (EPI) e Retroperitoneal (RET). Esta citocina é praticamente indetectável no músculo, fígado e tecido adiposo marrom. A análise adicional confirmou a não detecção da omentina no músculo (Figura 20B) comparado a amostra de tecido adiposo visceral como controle. A concentração de omentina no tecido adiposo visceral (Figura 20D) foi maior apenas no TAD comparado ao controle SD. Já a concentração sistêmica de omentina não foi alterada mediante as intervenções do treinamento (Figura 20C).

FIGURA 20 - Expressão proteica da Omentina.

A, Western blot representativo da omentina em animais Diabéticos nos tecidos: Tecido Adiposo Visceral (VIS), Retroperitoneal (RET), Epididimal (EPI), Tecido adiposo Marrom (TAM), Musculo (MUSC), Fígado (FIG) e Soro, B, Investigação da omentina no musculo, C, Valores de omentina no soro (ELISA), D, Omentina (40 kDa) no TAV frente aos protocolos experimentais, Resultados expressos em media \pm EP (n=6), SD, Sedentário diabético; TRD, Treinado Resistido diabético; TAD, Treinado Aeróbico diabético; TCD, Treinado Combinado diabético; São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Considerando o comportamento da vaspina, a análise de western blot de múltiplos tecidos (Figura 21A) indicou que esta citocina é altamente expressa no tecido adiposo visceral (VIS) e músculo, sendo pouco menos expressa no tecido adiposo epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET) e praticamente indetectável no fígado e tecido adiposo marrom (TAM). No entanto, está em grande concentração na forma circulante no soro. A concentração sistêmica de vaspina não foi alterada mediante as intervenções do treinamento (Figura 21B). No tecido adiposo visceral (Figura 21D) a concentração de vaspina não foi alterada pelos treinamentos, mas no musculo os protocolos de treinamento reduziram a concentração desta proteína, sendo que apenas o TAD e o TCD tiveram redução significativa comparado ao controle SD.

FIGURA 21-Expressão proteica da Vaspina.

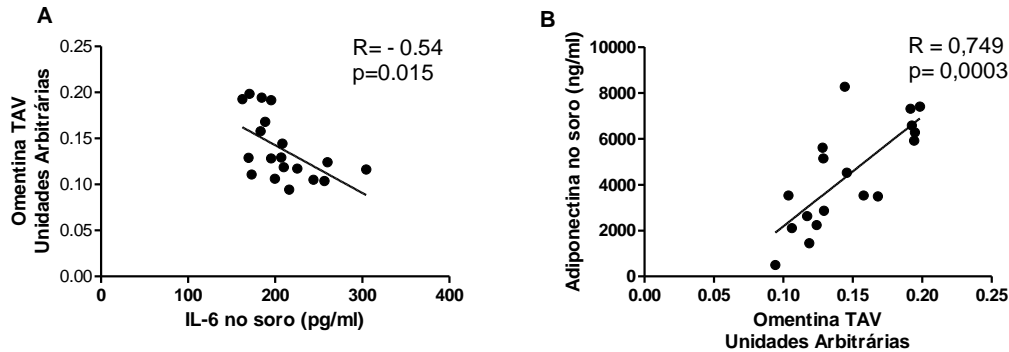


A, Western blot representativo da Vaspina nos tecidos de animais diabéticos: Tecido Adiposo Visceral (VIS), Retroperitoneal (RET), Epididimal (EPI), Tecido Adiposo Marrom (TAM), Musculo (MUSC), Fígado (FIG) e Soro. B, Valores de Vaspina no soro (ELISA, n=8). C, Vaspina (40 kDa) no TAV frente aos protocolos experimentais. D, Vaspina (40 kDa) no musculo frente aos protocolos experimentais. Resultados expressos em média ± EP (n=6). SD, Sedentário diabético; TRD, Treinado Resistido diabético; TAD, Treinado Aeróbico diabético; TCD, Treinado Combinado diabético; São significativamente diferentes entre eles para $p < 0,05$ (Bonferroni t-test comparações múltiplas). ^a vs. SN; ^b vs. TRN; ^c vs. TAN; ^d vs. TCN.

Correlações

Quando os níveis de omentina no tecido adiposo visceral foram estudados correlacionando com a concentração de IL-6 e Adiponectina no soro (Figura 22), expressão de omentina visceral está negativamente correlacionada com a IL-6 no soro ($r = -0,54$, $P = 0,015$ correlação negativa moderada). Por outro lado, a expressão de omentina visceral está positivamente correlacionada com a concentração de adiponectina circulante ($r = 0,749$, $P = 0,0003$, correlação positiva forte).

FIGURA 22-Correlação entre Omentina no Tecido Adiposo Visceral com IL-6 e Adiponectina sistêmicas.



A, Omentina x IL-6. B, Omentina x Adiponectina.

Discussão

Durante a última década, tornou-se claro que as adipocinas desempenham papel determinante nas alterações metabólicas observadas na obesidade. Neste sentido, estudos recentes têm demonstrado a grande importância de algumas dessas adipocinas no desenvolvimento e progressão de distúrbios relacionados com a obesidade e a síndrome metabólica, como também na patogênese do diabetes tipo 2 (FARAMARZI et al., 2016; STANFORD; MIDDELBEEK; GOODYEAR, 2015). Neste contexto, as adipocinas omentina e a vaspina atraíram o interesse da comunidade científica, principalmente em pesquisas com enfoque no estudo da obesidade e, conseqüentemente do diabetes tipo 2. Além disso, estudos com o objetivo de se encontrar uma forma não invasiva de controlar a obesidade e diabetes tem sido muito difundido.

Sendo assim, uma das formas de controlar o aumento patológico do tecido adiposo e o desenvolvimento de doenças correlacionadas, é a prática regular de exercício físico. O treinamento tem sido conhecido por causar adaptações no tecido adiposo branco, incluindo reduções no tamanho das células, produção de adipocinas e modulação da inflamação (DUARTE et al., 2008; HOPPS; CANINO; CAIMI, 2011; MIYAZAKI et al., 2010). Neste contexto, os principais achados de nosso estudo foi que os treinamentos resistido, aeróbico e combinado alteram a expressão de omentina no tecido adiposo visceral e os níveis de vaspina no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos, Estes efeitos estão associados com alterações bioquímicas e melhora na sensibilidade à insulina. Além disso,

confirmamos que a expressão de omentina no tecido adiposo está negativamente correlacionada com a IL-6 circulante e positivamente correlacionada com a adiponectina no soro.

Sabe-se que a omentina 1 é a forma circulante em maior quantidade da família das omentina e tem sido, predominantemente, estudada por pesquisadores. Recentemente, tem sido relatada como uma das adipocinas preferencialmente produzida e segregada pelo tecido adiposo visceral em comparação com o subcutâneo (YANG et al., 2006), sendo também expressa no coração, pulmões, ovário e placenta (SCHÄFFLER et al., 2005; YANG et al., 2006). De fato, observamos que a omentina, em animais diabéticos, está expressa diferentemente em cada depósito de gordura e no soro. A omentina mostrou-se altamente expressa no tecido adiposo visceral (VIS), pouco menos expressa no tecido adiposo epididimal (EPI) e retroperitoneal (RET), praticamente indetectável no músculo, fígado e tecido adiposo marrom, estando em grande concentração também no soro.

No tecido adiposo subcutâneo e em adipócitos viscerais a omentina aumenta o transporte de glicose e fosforilação de Akt estimulada pela insulina (YANG et al., 2006), sugerindo que omentina pode melhorar a sensibilidade à ação desse hormônio. Neste sentido, ficou clara a necessidade de investigar uma possível ação da omentina no músculo de ratos diabéticos treinados. No entanto, não foi detectada a presença de omentina no músculo desses animais. A atuação da omentina neste órgão ainda não é conhecida, uma vez que não há nenhuma conclusão sobre os seus receptores e o seu mecanismo de atuação nos tecidos em geral. Neste sentido, acredita-se que ela possa exercer função em vários órgãos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo subcutâneo, aumentando a sensibilidade à insulina e alterando o metabolismo da glicose (AUGUET et al., 2011). Deste modo, observamos que o treinamento atua na modulação da expressão proteica de omentina no tecido adiposo visceral, sendo que dentre os três protocolos de exercício estudado, o exercício aeróbico promoveu maior expressão da omentina. Vale ressaltar que estudos tem demonstrado que a expressão de omentina no tecido adiposo está positivamente correlacionada ao índice de obesidade, resistência à insulina, e os parâmetros do metabolismo lipídico. Deste modo, a diminuição da expressão do gene omentina pode contribuir para o agravamento das doenças correlacionadas a resistência à insulina (CAI et al., 2009). De fato, o exercício aeróbio promoveu, além do aumento da omentina no TAV e melhora na função da célula beta, indicando melhora na sensibilidade a insulina e conseqüentemente uma melhora na glicemia, o que pode refletir uma melhora no diabetes. Esses resultados são muito relevantes já que os animais permaneceram alimentados com dieta hiperlipídica até o fim do experimento.

Em relação aos níveis de omentina circulante, não existe um consenso na literatura de sua relação com a atividade física. De acordo com Cai et al, (2009), a expressão de omentina no tecido adiposo está positivamente correlacionada com os níveis de omentina no soro. Outros estudos com humanos mostram que o exercício aeróbico pode aumentar as concentrações de omentina circulante demonstrando que pode haver uma forte relação entre o desempenho no exercício e os níveis circulantes de omentina (SAREMI; ASGHARI; GHORBANI, 2010; WILMS et al., 2015). Neste sentido, Madsen et al, (2015) demonstraram que o exercício extenuante praticado por 8 semanas provocou aumento nos níveis de omentina, assim como o exercício moderado em ratas ovariectomizadas (BABAEI et al., 2015). Já um estudo com exercício aeróbico agudo (75% VO₂max) mostrou uma menor resposta nos níveis séricos de omentina-1 em indivíduos obesos em comparação com os indivíduos com peso normal (HUANG et al., 2016). Outros estudos não encontraram alteração nos níveis circulantes de omentina após três meses de treinamento aeróbio (3 vezes por semana, durante 30 min), apesar de uma profunda redução sobre o peso corporal, insulina de jejum e HOMA-IR (FARAMARZI et al., 2016; URBANOVÁ et al., 2014), corroborando com nossos resultados. Talvez, a dieta hiperlipídica, por aumentar a quantidade de glicose e lipídios, possa ter alterado a produção da omentina nos ratos diabéticos, além de contribuir para uma piora dos resultados benéficos promovidos pelo exercício físico, uma vez que os animais consumiram a dieta hiperlipídica até o final do experimento.

Por outro lado, o exercício combinado reduziu de maneira mais acentuada o tecido adiposo intra-abdominal retroperitoneal, mas com aumento nos níveis dos marcadores inflamatórios TNF- α e IL-6, que podem aumentar em resposta a exercícios muito extenuantes, ou seja, em resposta ao dano muscular (PEDERSEN et al., 2007) alterando o grau de inflamação. Neste sentido, a inflamação crônica de baixo grau é pensado para ser a chave na patogênese da resistência à insulina e diabetes tipo 2 mellitus (DM2) (HOTAMISLIGIL, 2006; OUCHI et al., 2011). O papel de tecido adiposo neste quadro é muito significativo uma vez que age como um órgão endócrino, secretando hormônios e citocinas anti e pró-inflamatória, além de inúmeras adipocinas que podem ter um papel central nesta inflamação (PIYA; MCTERNAN; KUMAR, 2013).

Sob condições normais os adipócitos lidam com a utilização da glicose para captura, produção e armazenamento de triglicerídeos pela lipogênese. Porém, quando o excesso de nutrientes ocorre, como no caso deste estudo, há uma sobrecarga de triglicerídeos, um aumento na capacidade de armazenamento do adipócito, favorecendo mudanças na arquitetura celular do mesmo, iniciando assim o estresse celular (Hernández-Díaz, et al,

2015b). Esse estresse celular é um estado de disfunção celular, que culminam no acúmulo de diacilglicerol (DAG), ácidos graxos saturados e ceramidas, resultando na hipertrofia do tecido adiposo com reforçada fibrose e hipóxia, os quais contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Este quadro causa a produção endógena de citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos, que aumenta e mantém a resposta inflamatória nos tecidos como fígado, músculo e o próprio tecido adiposo, estimulando a transcrição de moléculas pró-inflamatórias, IL-1 β , TNF- α , IL-6, Proteína C-reativa, e quimiocinas (MCP-1, IL-8 via ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Hernández-Díaz, et al, 2015). Neste contexto, a omentina é capaz de diminuir a atividade inflamatória mediada por NF- κ B, mostrando também uma ação na sensibilidade à insulina em células endoteliais (YAMAWAKI et al., 2011). No entanto, são necessários estudos para se elucidar o papel de omentina na inibição de NF- κ B, como por exemplo em adipócitos, uma vez que implicaria um possível efeito sobre a regulação da síndrome metabólica (Hernández-Díaz et al, 2015).

Por outro lado, o exercício aeróbio moderado tem sido utilizado com frequência para o controle do diabetes, principalmente por ser capaz de melhorar o quadro inflamatório decorrente do excesso de tecido adiposo. De fato, em nosso estudo, os treinamentos resistido e aeróbico foram capazes de diminuir a proteína C reativa e a IL-6, além de melhorar o sistema anti-inflamatório por estimular maiores níveis circulantes de adiponectina, sem deprimir significativamente o sistema imune de forma não a reduzir significativamente as citocinas anti-inflamatórias circulantes como IL-4 e IL-10. É sabido que o exercício aumenta as concentrações de adiponectina, o que pode assim mediar os efeitos na resistência à insulina, glicemia e lipidemia (BLÜHER et al., 2006; PASSOS; GONÇALVES, 2014). Melhorias em concentrações de adiponectina têm sido relatados após exercícios aeróbicos e resistido, mas os dados ainda são conflitantes, sendo que alguns trabalhos mostraram que as concentrações de adiponectina no soro não foram alteradas com o exercício (AHMADIZAD; HAGHIGHI; HAMEDINIA, 2007; PRAET; VAN LOON, 2009), outros já relataram seu aumento (BALDUCCI et al., 2010). Dessa forma os trabalhos mostram que, tanto o exercício resistido, aeróbico e o combinado tiveram influência sobre a adiponectina melhorando seus níveis em indivíduos com diabéticos tipo 2 e obesos. Além disso, pode haver ainda um efeito dose-resposta da intensidade de treinamento de resistência e o aumento da adiponectina (HOPPS; CANINO; CAIMI, 2011; SIMPSON; SINGH, 2008). Vale ressaltar que observamos que há uma relação direta entre os aumentos dos níveis de omentina e adiponectina, demonstrado pela forte correlação positiva em nosso estudo.

Analizamos também outra citocina importante produzida pelo tecido adiposo denominada vaspina, devido sua participação no metabolismo glicídico e no processo inflamatório, Estudos mostram que a expressão da vaspina foi mais frequentemente detectado no tecido adiposo visceral de ratos obesos em comparação com o tecido subcutâneo (SHAKER; SADIK, 2013). Assim, pode-se sugerir que a gordura visceral é o principal, mas não o único sítio para a síntese de vaspina na obesidade. Realmente, encontramos maior concentração dessa serpina no tecido adiposo visceral, soro e músculo dos animais diabéticos. Existem poucos estudos que mostram o desempenho do exercício físico sobre as concentrações de vaspina no tecido adiposo. Olfat G Shaker & Sadik (2013) mostraram que a expressão vaspina no tecido adiposo visceral não foi afetada pelo treinamento físico, o que corrobora com nossos achados. Em contraste, Hida et al, (2005) descobriram que o exercício de corrida na roda voluntária, suprimiu a expressão de vaspina no tecido adiposo visceral em modelo de rato com diabetes do tipo 2 sem fornecer uma explicação possível. Também, a concentração de vaspina circulante não foi alterada com os protocolos de exercício propostos neste estudo, mesmo tendo um leve aumento com o exercício aeróbico (25%), este não foi significativo. Os níveis de vaspina no soro foram estreitamente associados com a aptidão física em homens e atividade física em mulheres, independente da composição corporal (MIYATAKE et al., 2014). Youn et al, (2008b) relataram que o treinamento físico aeróbico durante 4 semanas resultou em níveis significativamente aumentados de vaspina em indivíduos com diabetes tipo 2 e este aumento foi significativamente correlacionado com as mudanças no consumo de oxigênio. Por sua vez, Choi & Kim (2010) relatou que os obesos, grupo com baixos níveis de aptidão cardiorrespiratória, mostraram concentrações de vaspina mais elevados do que o grupo obeso com níveis moderadamente elevados de aptidão cardiorrespiratória. Já outro estudo mostrou que não houve alteração nas concentrações de vaspina no soro de pacientes com diabetes mellitus tipo 2, com e sem estilos de vida ativos (KADOGLOU et al., 2011).

Por outro lado, no tecido muscular observou-se que os protocolos de treinamento reduziram os níveis de vaspina, sendo que o resistido reduziu em 23%, aeróbico 33% e 48% no grupo combinado. A concentração de vaspina no tecido muscular é pouco estudada e ainda não são claros os papéis desta adipocina como causadora ou protetor no desenvolvimento da obesidade, doenças metabólicas e sua modulação no músculo esquelético. Neste caso, o stress relacionado com o exercício poderia fornecer outra explicação plausível para a incapacidade do exercício em aumentar a concentração de vaspina no soro e reduzir no músculo, uma vez que a vaspina pertence à superfamília das serpinas e

muitas destas são reduzidas por estresse oxidativo induzido pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (SKALICKY et al., 2008), o que pode impedir seu aumento aparente. Neste contexto, um componente importantíssimo do exercício é o estresse que o indivíduo é submetido, e este não pode ser excluído. Oberbach et al, (2010) descobriram que o aumento do estresse oxidativo após o treinamento físico de curto e longo prazo diminui a concentração sérica de vaspina em homens jovens saudáveis. Diante disso, podemos especular esta redução da vaspina no músculo, pode ter ocorrido em função de um maior estresse provocado pelo exercício combinado, uma vez que aumentou os níveis de TNF e IL-6, além de ter aumentado os níveis de CK e LDH circulantes. Estas enzimas são conhecidas como importantes marcadores de dano muscular, além de auxiliar na monitoração da adaptação e do nível de exercício no sistema muscular (Mougios, 2007). Além disso, a CK pode ser considerada uma ferramenta importante na predição de overtraining e/ou lesão muscular (Machado, Zini, et al., 2011). O aumento das concentrações plasmáticas dessas enzimas está ligado à necrose celular e lesão tecidual após uma única sessão de exercícios, e podem ser causados tanto por estímulos mecânicos quanto metabólicos (Brancaccio, Maffulli & Limongelli, 2007; Mougios, 2007; Brancaccio, Lippi & Maffulli, 2010; Machado, Zini, et al., 2011).

Dessa forma, vemos que alguns estudos têm postulado que a indução da expressão de mRNA da vaspina no tecido adiposo humano poderia representar um mecanismo de compensação associada com obesidade e resistência a ação da insulina (KLÖTING et al., 2007; ZVONIC et al., 2007). Neste sentido, o tratamento de ilhotas pancreáticas isoladas com a vaspina, resultou em aumento da concentração de insulina sob condições de estimulação de glicose sem afetar a secreção da insulina pela célula- β e uma melhoria significativa da tolerância à glicose em camundogos C57BL/6NTac e db/db. Assim eles sugerem que há importante mecanismo anterior aos efeitos de diminuição da glicemia onde a vaspina pode aumentar a meia-vida da insulina em vez de melhorar a sua sensibilidade, ao atuar como um inibidor para a serpina protease que consome a insulina (HEIKER et al., 2013). Neste contexto, Heiker (2014) coloca que os mecanismos de ação da vaspina e seus tecidos alvo, seja como um ligante de receptores ligados à membrana ou como um inibidor de serina-protease, está longe de ser elucidada.

Portanto, mais estudos são necessários para determinar a atuação específica da omentina e vaspina frente à etiologia da obesidade e diabetes tipo 2. Nossos resultados podem sugerir que há um *crosstalk* do tecido muscular-esquelético e tecido adiposo com relação a omentina-1 e vaspina de forma que estão relacionadas ao metabolismo glicídico e principalmente pela sensibilidade a insulina. A diferença de resultados observado em nosso

estudo quando comparado a literatura, em relação aos níveis circulantes de omentina e vaspina, podem ter sido devido ao consumo contínuo da dieta hiperlipídica pelos animais diabéticos, uma vez que sabe-se que os resultados do treinamento são potencializados com o controle alimentar e calórico, principalmente em casos de diabetes tipo 2. Ainda assim, os protocolos de exercício apresentaram alterações importantes frente a condição metabólica.

Finalmente, podemos concluir que o treinamento físico pode ser um aliado para o controle do diabetes mellitus tipo 2 dependendo de sua intensidade, uma vez o treinamento aeróbico aumentou a concentração de omentina no tecido adiposo visceral e provocou a diminuição dos marcadores inflamatórios sistêmicos. Além disso, vimos que a diminuição dos níveis de vaspina no musculo pode ser um mecanismo de ajuste em resposta ao aumento do estresse provocado pelo treinamento combinado nestes ratos diabéticos, já que a alta intensidade de exercício se relaciona com a baixa concentração de vaspina no músculo. Portanto esses achados podem ser o passo inicial para futuras pesquisas visando estabelecer o papel destas adipocinas em melhorar a resistência à ação da insulina associada à obesidade e diabetes

5. CONCLUSÃO

A combinação entre dieta hiperlipídica e baixas doses de estreptozotocina foi um modelo eficiente para induzir diabetes tipo 2 em ratos, com alteração apenas na vaspina circulante neste estágio inicial da doença.

Os três protocolos de exercício foram benéficos em suas proporções em ratos eutróficos, sendo que o Aeróbico e o Combinado tiveram maior modulação sobre a inflamação, mesmo sem provocar alterações na concentração de omentina e vaspina. Em contrapartida, nos animais diabéticos, entre os três diferentes protocolos de exercícios analisados, apenas o treinamento aeróbico foi capaz de melhorar o perfil lipídico e reduzir a adiposidade visceral, promovendo a modulação da omentina no tecido adiposo visceral destes ratos, impedindo o aumento da glicemia. Já o exercício combinado pode ter sido extenuante para um diabético descompensado.

Encontramos também que a omentina no diabetes experimental tipo 2 tem uma ação anti-inflamatória como sugerido em outros estudos, uma vez que apresentou correlação negativa com a IL-6 e positiva com a adiponectina.

Assim, nossa investigação reforçou as evidências de que o exercício é uma importante estratégia não farmacológica no controle de doenças como o diabetes. Além disso, nossos dados sugerem que a omentina e a vaspina podem representar um novo biomarcador para a obesidade e resistência à insulina, contribuindo para o controle da obesidade e de suas comorbidades, já que estas foram moduladas pelo exercício.

6. REFERÊNCIAS

- AHMADIZAD, S.; HAGHIGHI, A. H.; HAMEDINIA, M. R. Effects of resistance versus endurance training on serum adiponectin and insulin resistance index. **European Journal of Endocrinology**, v. 157, n. 5, p. 625–631, 2007.
- AKBARZADEH, S. et al. The Effect of Stevia Rebaudiana on Serum Omentin and Visfatin Level in STZ-Induced Diabetic Rats. **Journal of dietary supplements**, v. 12, n. 1, p. 19390211, 2014.
- ALISSA, E. M. et al. Role of omentin-1 and C-reactive protein in obese subjects with subclinical inflammation. **Journal of Clinical and Translational Endocrinology**, v. 3, p. 7–11, 2016.
- ANTUNA-PUENTE, B. et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes & metabolism**, v. 34, n. 1, p. 2–11, fev. 2008.
- AUGUET, T. et al. New adipokines vaspin and omentin. Circulating levels and gene expression in adipose tissue from morbidly obese women. **BMC medical genetics**, v. 12, n. 1, p. 60, 2011.
- BABAEI, P. et al. The interactive effect of aerobic-resistance training and estrogen therapy on metabolic syndrome indices and omentin-1. **Physiology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 200–207, 2015.
- BALDUCCI, S. et al. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 20, n. 8, p. 608–17, 2010.
- BERMUDEZ, E. A. et al. Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 10, p. 1668–1673, 2002.
- BLÜHER, M. et al. Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: Associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 6, p. 2310–2316, 2006.
- BLÜHER, M. Vaspin in obesity and diabetes: Pathophysiological and clinical significance. **Endocrine**, v. 41, n. 2, p. 176–182, 2012.

- BORST, S. E.; CONOVER, C. F.; BAGBY, G. J. Association of resistin with visceral fat and muscle insulin resistance. **Cytokine**, v. 32, n. 1, p. 39–44, 2005.
- CAI, R. C. et al. Expression of omentin in adipose tissues in obese and type 2 diabetic patients. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 89, n. 6, p. 381–384, 2009.
- CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **The Journal of endocrinology**, v. 220, n. 2, p. T47–59, 2014.
- CHOI, K.; KIM, Y. B. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. **Korean J Intern Med**, v. 25, n. 2, p. 119–129, 2010.
- CINTI, S. The adipose organ. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 73, n. 1 SPEC. ISS., p. 9–15, 2005.
- DE LEMOS, E. T. et al. Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. **Med Sci Monit**, v. 13, n. 8, p. BR168–74, 2007.
- DE LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Stressed out about obesity and insulin resistance. **Nature medicine**, v. 12, n. 1, p. 41–42; discussion 42, 2006.
- DE SOUZA BATISTA, C. M. et al. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1655–1661, 2007.
- DEROSA, G. et al. Adipocytokine levels in obese and non-obese subjects: An observational study. **Inflammation**, v. 36, n. 4, p. 914–920, 2013.
- DIMOVA, R.; TANKOVA, T. The Role of Vaspin in the Development of Metabolic and Glucose Tolerance Disorders and Atherosclerosis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–7, 2015.
- DUARTE, F. O. et al. Caloric restriction and refeeding promoted different metabolic effects in fat depots and impaired dyslipidemic profile in rats. **Nutrition**, v. 24, p. 177–186, 2008.
- EARNEST, C. P. et al. **Maximal estimated cardiorespiratory fitness, cardiometabolic risk factors, and metabolic syndrome in the aerobics center longitudinal study**. Mayo Clinic Proceedings. **Anais...**2013
- ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218–224, 2004.
- FAIN, J. N. Release of Inflammatory Mediators by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily by the Nonfat Cells: A Review. **Mediators of Inflammation**, v. 2010,

p. 1–20, 2010.

FARAMARZI, M. et al. Effects of rhythmic aerobic exercise plus core stability training on serum omentin, chemerin and vaspin levels and insulin resistance of overweight women. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 56, n. 4, p. 476–82, abr. 2016.

FENG, W. H. et al. Correlated increase of omentin-1 and adiponectin by exenatide, avandamet and dietary change in diet-induced obese rats. **Folia Biol (Praha)**, v. 59, n. 6, p. 217–224, 2013.

FERNANDEZ, A. C. et al. Influência do treinamento aeróbio e anaeróbio na massa de gordura corporal de adolescentes obesos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 3, p. 152–164, 2004.

FESTA, A. et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Predict the The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **Diabetes**, v. 51, n. May 2001, p. 1131–1137, 2002.

FIDAN, I. et al. Evaluation of the natural killer cytotoxicity and the levels of cytokines in rats with type i diabetes mellitus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 883–887, 2005.

FIGUEIREDO BRAGGION, G. et al. Morphological and Biochemical Effects on the Skeletal Muscle of Ovariectomized Old Female Rats Submitted to the Intake of Diets with Vegetable or Animal Protein and Resistance Training. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 9251064, 2016.

FLEHMIG, G. et al. Identification of adipokine clusters related to parameters of fat mass, insulin sensitivity and inflammation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

FOSTER-SCHUBERT, K. E.; CUMMINGS, D. E. **Emerging therapeutic strategies for obesity** **Endocrine Reviews**, 2006.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 103, p. 693–699, 2007.

GOKHALE, R.; CHANDRASHEKARA, S.; VASANTHAKUMAR, K. C. Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes-an adaptive response. **Cytokine**, v. 40, n. 2, p. 123–127, 2007.

GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; DE OLIVEIRA, M. R. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, n. 1, p. 756132, 2012.

GULCELİK, N. E. et al. Serum vaspin levels in type 2 diabetic women in relation to microvascular complications. **European Journal of Endocrinology**, v. 160, n. 1, p. 65–70, 2009.

HARRISON, M. et al. Lipoprotein particle distribution and skeletal muscle lipoprotein lipase activity after acute exercise. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 64, 2012.

HEIDEMANN, J. et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8508–8515, 2003.

HEIKER, J. T. et al. Vaspin inhibits kallikrein 7 by serpin mechanism. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 70, n. 14, p. 2569–2583, 2013.

HEIKER, J. T. **Vaspin (serpinA12) in obesity, insulin resistance, and inflammation** **Journal of Peptide Science**, 2014.

HERMSDORFF, H. H.; MONTEIRO, J. B. [Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem?]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 48, n. 6, p. 803–811, 2004.

HERNÁNDEZ-DÍAZ, A. et al. Omentina: papel en la resistencia a la insulina, inflamaci{ó}n y protecci{ó}n cardiovascular. **Archivos de Cardiolog{í}a de M{é}xico**, n. xx, p. 1–11, nov. 2015a.

HERNÁNDEZ-DÍAZ, A. et al. Omentina: papel en la resistencia a la insulina, inflamación y protección cardiovascular. **Archivos de Cardiología de México**, n. xx, p. 1–11, nov. 2015b.

HERNÁNDEZ-DÍAZ, A. et al. [Omentin: Role in insulin resistance, inflammation and cardiovascular protection]. **Archivos de cardiologia de Mexico**, n. xx, p. 1–11, 19 nov. 2015c.

HIDA, K. et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10610–5, 2005.

HOPPS, E.; CANINO, B.; CAIMI, G. Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. **Acta Diabetologica**, v. 48, n. 3, p. 183–189, 2011.

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

HOROWITZ, J. F. **Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise** **Trends in**

Endocrinology and Metabolism, 2003.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–7, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HU, F. B. et al. Inflammatory Markers and Risk of Developing Type 2 Diabetes in Women. **Diabetes**, v. 53, n. 3, p. 693–700, 2004.

HUANG, C.-J. et al. The impact of acute aerobic exercise on chitinase 3-like protein 1 and intelectin-1 expression in obesity. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 241, n. 2, p. 216–21, 2016.

IBGE. **IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.ibge.sidra.gov.br/>>.

IOSSA, S. et al. Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. **The British journal of nutrition**, v. 90, p. 953–960, 2003.

IRIGOYEN, M.-C. et al. Exercise Training Improves Baroreflex Sensitivity Associated With Oxidative Stress Reduction in Ovariectomized Rats. **Hypertension**, v. 46, n. 4, p. 998–1003, 2005.

KADOGLU, N. P. E. et al. Impact of atorvastatin on serum vaspin levels in hypercholesterolemic patients with moderate cardiovascular risk. **Regulatory Peptides**, v. 170, n. 1-3, p. 57–61, 2011.

KLÖTING, N. et al. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. **Cell metabolism**, v. 6, n. 1, p. 79–87, jul. 2007.

KOENIG, W.; KHUSEYINOVA, N. **Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature Publishing Group**, 2016.

LANDERS-RAMOS, R. Q. et al. Circulating angiogenic and inflammatory cytokine responses to acute aerobic exercise in trained and sedentary young men. **European Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 7, p. 1377–1384, 2014.

- LEAL, V. DE O.; MAFRA, D. **Adipokines in obesity** *Clinica Chimica Acta*, 2013.
- LEE, H.; LEE, I. S.; CHOUE, R. Obesity, inflammation and diet. **Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition**, v. 16, n. 3, p. 143–152, 2013.
- LEITE, L.; ROCHA, É.; NETO, J. Obesidade : uma doenç{a} inflamató{ria} Obesity : an inflammatory disease. **Revista Ciê{nc}ia & Sa{ú}de**, v. 2, p. 85–95, 2009.
- LI, Q. et al. A novel adipocytokine, visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor (vaspin), and obesity. **The Journal of international medical research**, v. 36, n. 4, p. 625–9, 2008.
- MADSEN, S. M. et al. Does 8 weeks of strenuous bicycle exercise improve diabetes-related inflammatory cytokines and free fatty acids in type 2 diabetes patients and individuals at high-risk of metabolic syndrome? **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 121, n. 4, p. 129–138, 2015.
- MANN, S.; BEEDIE, C.; JIMENEZ, A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. **Sports Medicine**, v. 44, n. 2, p. 211–221, 2014.
- MARQUES, C. M. M. et al. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 43, n. 5, p. 467–75, 2010.
- MILLER, W. C. Effective Diet and Exercise Treatments for Overweight and Recommendations for Intervention. **Sports Medicine**, v. 31, n. 10, p. 717–724, 2012.
- MIYATAKE, N. et al. Serum vaspin levels are associated with physical activity or physical fitness in Japanese: a pilot study. **Environmental Health & Preventive Medicine**, v. 19, n. 3, p. 200–206, 2014.
- MIYAZAKI, S. et al. Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. **Life Sciences**, v. 86, n. 17-18, p. 691–698, 2010.
- MORENO-NAVARRETE, J. M. et al. Circulating omentin concentration increases after weight loss. **Nutrition & metabolism**, v. 7, p. 27, 2010.
- MU, J. et al. Chronic Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 With a Sitagliptin Analog Preserves Pancreatic -Cell Mass and Function in a Rodent Model of Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1695–1704, 2006.
- NIEMAN, D. C. et al. Blood leukocyte mRNA expression for IL-10, IL-1Ra, and IL-8, but

- not IL-6, increases after exercise. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 26, n. 9, p. 668–74, 2006.
- NIEMAN, D. C. et al. Variance in the Acute Inflammatory Response to Prolonged Cycling Is Linked to Exercise Intensity. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 32, n. 1, p. 12–17, 2012.
- NIETO-VAZQUEZ, I. et al. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 183–194, 2008.
- OBERBACH, A. et al. Serum vaspin concentrations are decreased after exercise-induced oxidative stress. **Obesity Facts**, v. 3, n. 5, p. 328–331, 2010.
- OSTROWSKI, K. et al. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. **The Journal of Physiology**, v. 513, n. 3, p. 889–894, dez. 1998.
- OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.
- PASSOS, M. C. F.; GONÇALVES, M. C. Regulation of insulin sensitivity by adiponectin and its receptors in response to physical exercise. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 46, n. 9, p. 603–8, 2014.
- PEDERSEN, B.; FEBBRAIO, M. Point : Counterpoint Interleukin-6 does / does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. **Journal of applied physiology**, v. 102, n. 16, p. 814–819, 2007.
- PEDERSEN, B. K. et al. Role of myokines in exercise and metabolism. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 103, n. 3, p. 1093–1098, 2007.
- PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P. DE; LANCHETA JR., A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, p. 111–127, 2003.
- PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154–1162, 2005.
- PIYA, M. K.; MCTERNAN, P. G.; KUMAR, S. Adipokine inflammation and insulin resistance: The role of glucose, lipids and endotoxin. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 1, 2013.

- POPKO, K. et al. Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. **European journal of medical research**, v. 15 Suppl 2, p. 120–2, 4 nov. 2010.
- PRADHAN, A D. et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 3, p. 327–334, 2001.
- PRAET, S. F. E.; VAN LOON, L. J. C. Exercise therapy in Type 2 diabetes. **Acta Diabetologica**, v. 46, n. 4, p. 263–278, 2009.
- RAHIMLOU, M. et al. Association of circulating adipokines with metabolic dyslipidemia in obese versus non-obese individuals. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, 2015.
- ROEP, B. O. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia**, v. 46, p. 305–321, 2003.
- ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **The Journal of physiology**, v. 577, n. Pt 3, p. 997–1007, 2006.
- SAAD, M. I.; KAMEL, M. A.; HANAFI, M. Y. Modulation of Adipocytokines Production and Serum NEFA Level by Metformin, Glimepiride, and Sitagliptin in HFD/STZ Diabetic Rats. **Biochemistry research international**, v. 2015, p. 138134, 2015.
- SAREMI, A; ASGHARI, M.; GHORBANI, A. Effects of aerobic training on serum omentin-1 and cardiometabolic risk factors in overweight and obese men. **Journal of sports sciences**, v. 28, n. 9, p. 993–998, 2010.
- SBD, S. B. DE D. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015. **Diabetes**, v. 1, 2015.
- SCHÄFFLER, A. et al. Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1732, n. 1-3, p. 96–102, 2005.
- SCHRAUWEN, P.; WESTERTERP, K. R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. **The British journal of nutrition**, v. 84, n. 4, p. 417–427, 2000.
- SCOTT, J. P. R. et al. Effect of exercise intensity on the cytokine response to an acute bout of running. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 12, p. 2297–2306, 2011.

SENE-FIORESE, M. et al. Efficiency of Intermittent Exercise on Adiposity and Fatty Liver in Rats Fed With High-fat Diet. **Obesity**, v. 16, n. 10, p. 2217–2222, 2008.

SHAKER, O. G.; SADIK, N. A. H. Vaspin gene in rat adipose tissue: relation to obesity-induced insulin resistance. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 229–239, 2013.

SIMPSON, K. A; SINGH, M. A F. Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 16, n. 2, p. 241–256, 2008.

SKALICKY, J. et al. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 4, p. 499–505, 2008.

SPERETTA, G. F. et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. **Life sciences**, v. 146, p. 154–62, 1 fev. 2016.

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, dez. 2012.

SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological research**, v. 52, n. 4, p. 313–320, 2005a.

SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological research**, v. 52, n. 4, p. 313–320, out. 2005b.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. **The Indian journal of medical research**, v. 125, n. 3, p. 451–472, mar. 2007.

STANFORD, K. I.; MIDDELBEEK, R. J. W.; GOODYEAR, L. J. Exercise effects on white adipose tissue: Beiging and metabolic adaptations. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2361–2368, 2015.

SZKUDELSKA, K.; NOGOWSKI, L.; SZKUDELSKI, T. Adipocyte dysfunction in rats with streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 2, p. 86–94, 2014.

TAMBALIS, K. et al. Responses of blood lipids to aerobic, resistance, and combined aerobic with resistance exercise training: a systematic review of current evidence. **Angiology**, v. 60, n. 5, p. 614–632, 2009.

TOU, J. C. L.; WADE, C. E. Determinants affecting physical activity levels in animal models.

- Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 227, n. 8, p. 587–600, 2002.
- TOUATI, S. et al. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 3, p. 398–407, 2011.
- TRUJILLO, M. E.; SCHERER, P. E. **Adiponectin - Journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome****Journal of Internal Medicine**, 2005.
- URBANOVÁ, M. et al. Serum concentrations and subcutaneous adipose tissue mRNA expression of omentin in morbid obesity and type 2 diabetes mellitus: the effect of very-low-calorie diet, physical activity and laparoscopic sleeve gastrectomy. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 63, n. 2, p. 207–18, 2014.
- VASSILAKOPOULOS, T. et al. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 94, n. 3, p. 1025–1032, 2003.
- WADA, J. Vaspin: a novel serpin with insulin-sensitizing effects. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 17, n. 3, p. 327–33, mar. 2008.
- WILMS, B. et al. Plasma omentin-1 levels are related to exercise performance in obese women and increase upon aerobic endurance training. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 123, n. 3, p. 187–192, 2015.
- WILSON, R. D.; ISLAM, M. S. Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. **Pharmacological reports : PR**, v. 64, n. 1, p. 129–39, 2012.
- WOODS, S. C. et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1081–1087, 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. p. 88, 2016.
- YAMAWAKI, H. et al. Omentin, a novel adipocytokine inhibits TNF-induced vascular inflammation in human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 408, n. 2, p. 339–343, 2011.
- YAN, Z. et al. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 110, n. October 2010, p. 264–274, 2011.
- YAN, Z. C. et al. Exercise reduces adipose tissue via cannabinoid receptor type 1 which is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- δ . **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, n. 2, p. 427–433, 2007.

YANG, R.-Z. et al. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 290, n. 6, p. E1253–E1261, 2006.

YOUN, B. S. et al. Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. February, p. 372–377, 2008a.

YOUN, B. S. et al. Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. February, p. 372–377, 2008b.

ZABETIAN-TARGHI, F. et al. Modulatory Role of Omentin-1 in Inflammation: Cytokines and Dietary Intake. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 59, n. 12, p. 1–9, 22 jun. 2016.

ZANUSO, S. et al. **Exercise for the management of type 2 diabetes: A review of the evidence** *Acta Diabetologica*, 2010.

ZVONIC, S. et al. Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 6, n. 1, p. 18–28, 2007.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propp.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais**nº 008/2013**

Protocolo nº. 008/13

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Papel dos treinamentos: aeróbico, resistido e combinado sobre citocinas inflamatórias, adipocinas e danos teciduais em animais obesos com diabetes mellitus 2*" submetido pelo pesquisador *Cynthia Aparecida de Castro*.

São Carlos, 20 de março de 2013.

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais