



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - SBFIS**



**EVERALDO NERY DE ANDRADE**

**IMPLICAÇÕES DA TERAPIA ULTRASSÔNICA E/OU DO  
TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO DO  
TECIDO ADIPOSEO E HEPÁTICO DE RATOS *WISTAR*  
MACHOS EUTRÓFICOS**

Vitória da Conquista, BA  
2015

**EVERALDO NERY DE ANDRADE**

**IMPLICAÇÕES DA TERAPIA ULTRASSÔNICA E/OU DO  
TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO DO  
TECIDO ADIPOSEO E HEPÁTICO DE RATOS *Wistar*  
MACHOS EUTRÓFICOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas / Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientador: Prof. Dr. Candido Celso Coimbra  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Vitória da Conquista, BA  
2015

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Andrade, Everaldo Nery de

Implicações da terapia ultrassônica e/ou do treinamento físico sobre o metabolismo do tecido adiposo e hepático de ratos Wistar machos eutróficos / Everaldo Nery de Andrade. – 2015.

145 f.: il.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão.

Co-orientador: Prof. Dr. Candido Celso Coimbra.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2015.

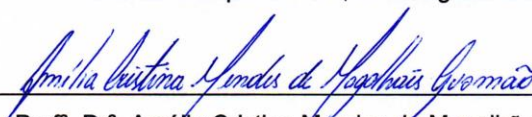
1. Exercício físico. 2. Terapia por Ultrassom. 3. Inflamação. 4. Metabolismo.  
5. Ratos Wistar. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Gusmão, Amélia Cristina M. Magalhães. III. Coimbra, Candido Celso.  
IV. Título.

CDU: 616-056.25

**EVERALDO NERY DE ANDRADE**

**IMPLICAÇÕES DA TERAPIA ULTRASSÔNICA E/OU DO  
TREINAMENTO FÍSICO SOBRE O METABOLISMO DO TECIDO  
ADIPOSO E HEPÁTICO DE RATOS WISTAR MACHOS  
EUTRÓFICOS**

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do grau de doutor em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista – BA, 25 de agosto de 2015.



Profª. Drª. Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão

Universidade Federal da Bahia



Profª. Drª. Telma de Jesus Soares

Universidade Federal da Bahia



Profª. Drª. Gilvanéia Silva Santos

Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. José Ailton Oliveira Carneiro

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



Prof. Dr. Rafael Pereira de Paula

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

A todos aqueles que buscam o equilíbrio, acrescentar mais vida aos seus anos e sabem que não é apenas a ciência que melhorará a qualidade de vida das pessoas, mas, principalmente, a nossa consciência, nossas escolhas, pois ciência sem consciência é desperdício e morte.

## **AGRADECIMENTOS**

A nosso Deus por ter permitido ter saúde e disposição suficiente para o ingresso, realização e concretização dos meus estudos acadêmicos.

Ao povo brasileiro e, especialmente, aos baianos por subsidiarem os meus estudos.

À FAPESB pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto de doutorado.

À UESB pela liberação das minhas atividades acadêmicas e administrativas, sem a qual não seria possível eu me dedicar integralmente ao curso.

Aos animais utilizados nesse experimento, os quais foram tratados com ética, respeito e carinho.

A minha mãe por ser um exemplo de determinação e inspiração, companheira sempre presente nos momentos bons e difíceis.

Aos meus irmãos, Dinho, Josy e Lui pelo apoio constante.

A banca examinadora da qualificação, inclusive o Prof. Flávio de Castro Magalhães, cuja presença não foi possível na banca de doutorado, mas que, certamente, junto com os demais componentes contribuiu para a lapidação deste trabalho.

A todos os componentes da banca examinadora de defesa pelo aceite em participar e contribuir com sugestões valorosas e generosas.

Aos colegas de mestrado e doutorado pelo convívio prazeroso, especialmente a Lilianny, Kely, Samira, Luciano, Grazielle Prates, Caline, Fernanda e Raildo.

Aos colegas Luciano e Grazielle Prates pelo treinamento para a realização dos procedimentos de imuno-histoquímica.

Aos colegas de iniciação científica, em especial a Samuel, Murilo, Gabriel, Ingrid, Amanda Alves, André, Amanda Rocha, Maiara, Grazielle Oliveira, Thiago, Isabel, Luis Alberto, Mirlana, Deisiane pelo auxílio constante durante todas as fases do doutorado.

Ao colega de iniciação do laboratório de patologia, Lício pelo auxílio na realização do ELISA.

Ao técnico de laboratório da UFMG, Luiz Antônio Cássio, profissional competente e amigo que me auxiliou na realização dos experimentos de radioimunoensaio.

Aos técnicos de laboratório da UFBA, Robson, Cláudio e em especial, Lucimara pelo treinamento para a realização dos cortes histológicos.

Aos meus professores do ensino fundamental, médio e superior que de alguma

forma construíram academicamente e incentivaram a ter certeza do meu interesse pela ciência, em especial, Almira, Miralva, Márcia, Amilton, Ceres, José Carvalho, Wilson Rocha (in memoriam), Gesivaldo Santos, Giovana Porto, Najara de Oliveira Belo.

Aos meus pacientes de fisioterapia dermatofuncional e alunos de graduação e especialização que despertaram o meu interesse pelo esclarecimento de algumas incógnitas do meu objeto de estudo neste trabalho.

Ao professor Anderson Santos Souza, Matheus Lopes Cortes e Juliano Geraldo Amaral pelo apoio em alguns experimentos realizados.

Aos professores Leandro Martins de Freitas, Laize Tomazi, Lucas Miranda Marques pela disponibilidade e auxílio em várias etapas dos procedimentos de biologia molecular e ao professor Robson Amaro Augusto da Silva, nos de histologia.

Ao professor Antônio Braga pela contínua disponibilidade e sugestões nas análises estatísticas.

A técnica Ana Paula Silva Pereira, do laboratório Micro pela realização de alguns cortes histológicos.

A professora Regiane Yatsuda pelos auxílios no uso do Software Image J e em algumas análises estatísticas.

Ao professor Márcio Vasconcelos Oliveira e demais bioquímicos do Hospital Esau Matos e Regional de Vitória da Conquista pela realização dos experimentos de dosagem de ácidos graxos livres, proteína C reativa, estradiol e testosterona.

Ao professor, co-orientador Cândido Celso Coimbra pela preciosa contribuição nesse trabalho e pelo auxílio e acolhimento em seu laboratório para realização dos experimentos de radioimunoensaio.

A professora Amélia Cristina Mendes de Magalhães, uma legítima orientadora, não somente pelas contribuições acadêmicas para a elaboração, condução e finalização deste trabalho, mas também pelo exemplo constante de ética, responsabilidade, humildade e coragem, a qual aceitou prontamente orientar meu sonho de estudo de doutorado.

A Sofia, filha da Profa. Amélia, que mesmo em sua inocência, essa criança cheia de luz parecia colaborar alegremente, disponibilizando e dividindo o tempo de sua mãe para que ela me orientasse no momento final deste trabalho.

Uma árvore em flor fica despida no outono. A beleza transforma-se em feiúra, a juventude em velhice e o erro em virtude. Nada fica sempre igual e nada existe realmente. Portanto, as aparências e o vazio existem simultaneamente

Dalai Lama



ANDRADE, Everaldo Nery de. Implicações da terapia ultrassônica e/ou do treinamento físico sobre o metabolismo do tecido adiposo e hepático de ratos *Wistar* machos eutróficos. 145 f. il. 2015. Tese (Doutorado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

## RESUMO

A terapia ultrassônica e o treinamento físico, isoladamente, reduzem a massa corporal e de tecido adiposo, porém com efeitos contrários em relação ao perfil lipídico e metabólico. Contudo, há carência de evidências sobre os efeitos da associação desses dois recursos sobre o metabolismo do tecido adiposo e hepático. O objetivo desse estudo foi avaliar as implicações da estimulação ultrassônica associada ou não ao treinamento físico sobre o perfil metabólico e inflamatório sistêmico, do tecido adiposo e hepático. Foram utilizados 68 ratos *Wistar* machos, alimentados com dieta padrão, submetidos ou não ao treinamento físico de intensidade moderada e a terapia ultrassônica, não focada, pulsátil de 3W/cm<sup>2</sup> na região abdominal. Foram mensurados a massa corporal, o índice de obesidade e a tolerância à glicose ao final das terapias. Após a eutanásia dos animais, foi determinado o perfil bioquímico metabólico, inflamatório e hormonal. Os tecidos hepático, adiposo subcutâneo abdominal (TASC), mesentérico (TAME), epididimal (TAE), retroperitoneal (TAR) e marrom (TAMAR) foram removidos, pesados e submetidos às análises morfológicas, de imuno-histoquímica e de expressão gênica. A expressão gênica de receptor  $\beta_3$ -adrenérgico, lipase hormônio sensível (HSL), lipoproteína lipase (LPL), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), proteína quinase do tipo A (PKA), lipase de triglicerídeo (ATGL), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) em tecido adiposo e de IL-6, TNF- $\alpha$  e beta-actina no fígado foram mensuradas por RT-PCR. O treinamento físico reduziu a massa corporal, a massa e o volume dos adipócitos do TASC e a massa do tecido adiposo visceral total (TAV), aumentou a lipólise e a testosterona total, diminuiu a leptina, ativou o TAMAR, reduziu a expressão de citocinas inflamatórias, manteve a homeostase da insulina e da glicose e não alterou os ácidos graxos livres. A terapia ultrassônica isolada diminuiu a massa corporal, o volume e o número de adipócitos no TASC e o número de adipócitos no TAV, a expressão gênica de LPL no TAR, aumentou a de ATGL no TAME. Além disso, aumentou a expressão gênica de IL-6 no TASC e TAME, a IL-6 plasmática, o número de macrófagos no TAME, a insulina plasmática, a razão estradiol/testosterona e ocasionou resistência à insulina. Entretanto, a associação das terapias, em comparação com o uso isolado do ultrassom, determinou a normalização dos níveis plasmáticos e de resistência à insulina, melhora na tolerância à glicose, manutenção do perfil inflamatório sistêmico e aumento da inflamação no tecido adiposo. Comparada com a realização isolada de treinamento físico, a associação das terapias diminuiu o volume do TAE, mas aumentou o perfil inflamatório do tecido adiposo. Não foram observadas alterações morfológicas e inflamatórias no tecido hepático pelas terapias isoladas ou associadas. Desta forma, conclui-se que o treinamento físico e a terapia ultrassônica reduzem o TASC e TAV, porém o treinamento físico isolado apresentou vantagens em relação à terapia ultrassônica por diminuir a produção de citocinas inflamatórias e manter a homeostase da insulina e do perfil lipídico. Em contrapartida, a

associação dos tratamentos não demonstrou vantagens em comparação à realização isolada do treinamento físico.

**Palavras-chaves:** Exercício físico. Terapia por ultrassom. Inflamação. Metabolismo. Ratos *Wistar*.

ANDRADE, Everaldo Nery de. Implications of ultrasound therapy and/or physical training on the metabolism of adipose and liver tissue of eutrophic male Wistar rats. 145 pp. ill. 2015. Thesis (Doctorate) - Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, Vitoria da Conquista, 2015.

## ABSTRACT

The ultrasound therapy and physical training alone reduces the body and adipose tissue mass, but with opposite effects on the lipid and metabolic profile. However, there is a lack of evidence on the effects of the combination of these two therapies on the metabolism of adipose and liver tissue. The aim of this study was to evaluate the implications of ultrasonic stimulation with or without the physical training on the metabolic and systemic inflammation profile of the adipose and liver tissue. Sixty-eight male Wistar rats were used, fed with a standard diet, submitted or not to progressive physical training of moderate intensity and ultrasound therapy, not focused, pulsed 3W/cm<sup>2</sup> in the abdominal area. Body weight, obesity index and glucose tolerance at the end of therapy were measured. The liver, abdominal subcutaneous adipose tissue (SAT), mesenteric (MAT), epididymal (EAT), retroperitoneal (RAT) and brown (BAT) were removed, weighed and subjected to morphological analysis, immunohistochemistry and gene expression. The gene expression  $\beta$ 3-adrenergic receptor, hormone sensitive lipase (HSL), lipoprotein lipase (LPL), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), protein kinase type A (PKA), triglyceride lipase (ATGL), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in adipose tissue and of IL-6, TNF- $\alpha$  and beta-actin in the liver were performed by RT-PCR. Physical training reduced body mass, SAT adipocytes mass and volume, total visceral adipose tissue (TVAT), increased lipolysis and total testosterone, reduced leptin, activated BAT, reduced the expression of inflammatory cytokines, improved homeostasis of insulin and glucose and did not affect the free fatty acids. Ultrasound therapy reduced the body mass, the volume and number of adipocytes in SAT and number of adipocytes in TVAT, reduced LPL gene expression in the RAT and increased the ATGL in MAT. In addition, increased IL-6 gene expression in SAT and MAT, plasma IL-6 and the number of macrophages in the MAT, plasma insulin, the ratio estradiol/testosterone and insulin resistance. However, the association of therapies, compared with the isolated use of ultrasound determined the normalization of plasma levels and insulin resistance, improvement in glucose tolerance, systemic inflammatory profile maintenance and increased inflammation in adipose tissue. Compared to the isolated conducting physical training, the association of therapies decreased the volume of EAT, but increased the inflammatory profile of adipose tissue. There were no morphologic and inflammatory changes in liver tissue by isolated or associated therapies. Thus, it is concluded that physical training and ultrasound therapy reduces SAT and TVAT, but isolated physical training showed benefits in relation to the ultrasound therapy by reducing inflammatory cytokines production and by maintaining homeostasis of insulin and lipid profile. In contrast, the combination of treatments, showed no benefits over the isolated realization of physical training.

**Keywords:** Physical exercise. Ultrasound therapy. Inflammation. Metabolism. Wistar rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Regulação da lipólise em adipócitos.....	30
Figura 2 - Ácidos graxos e citocinas utilizam mecanismos de sinalização similares para ativar a resposta inflamatória na obesidade..	33
Figura 3 - Procedimentos experimentais realizados nos 68 ratos <i>Wistar</i> .....	46
Figura 4 – Foto ilustrativa do período de seleção dos ratos aptos para a atividade física em esteira motorizada elétrica AVS Projetos®.....	47
Figura 5 – Foto ilustrativa da aplicação da terapia ultrassônica. ....	50
Figura 6 – Foto ilustrativa do cabeçote do aparelho de ultrassom Sonacel Expert 3MHz reduzido a 0,5cm <sup>2</sup> . ....	52
Figura 7 - Distribuição dos animais conforme os procedimentos experimentais.....	53
Figura 8 – Foto ilustrativa da mensuração da pressão arterial por pletismografia de cauda. ....	53
Figura 9 - Variação da massa corporal em relação ao número de sessões dos grupos experimentais UC, US1, US2 e US3..	71
Figura 10 - Massa (g/100g) de massa corporal de tecido adiposo mesentérico (A), teste K-W=12,01; p<0,01, epididimal (B), teste F=5,78; p<0,01, retroperitoneal (C), teste F=1,32; p=0,29, subcutâneo (D), teste F=3,79; p<0,05, visceral total (E), teste F=4,64; p<0,05 dos grupos experimentais US1, US2 e US3.....	72
Figura 11 - Volume (10 <sup>-9</sup> mL) dos adipócitos do tecido adiposo mesentérico (A), teste de K-W= 15,00; p<0,01, epididimal (B), teste de K-W= 18,78; p<0,001, retroperitoneal (C), teste de K-W= 6,16; p>0,05 e subcutâneo (D), teste de K-W= 26,70; p<0,0001 dos grupos experimentais US1, US2 e US3..	73
Figura 12 - Área lipídica no tecido adiposo marrom dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU após a realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica, teste de K-W= 9,279; p=0,0258.....	84
Figura 13 - Fotomicrografias ilustrativas dos adipócitos corados com hematoxilina e eosina do tecido adiposo mesentérico nos grupos NS (A), NU (B), TS (C) e TU (D),	

retroperitoneal nos grupos NS (E), NU (F), TS (G) e TU (H), epididimal nos grupos NS (I), NU (J), TS (K) e TU (L), subcutâneo nos grupos NS (M), NU (N), TS (O) e TU (P) e marrom nos grupos NS (Q), NU (R), TS (S) e TU (T), em aumento de 20x. ...85

Figura 14 - Número de macrófagos no tecido hepático dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU após a realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica, teste F= 1,22; p=0,6515 para a variável treinamento físico e teste F= 1,29, p=0,6428 para a variável terapia ultrassônica.. .....95

Figura 15 - Expressão gênica de TNF- $\alpha$  (A) e IL-6 (B) no fígado dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU após a realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica, teste F= 2,96; p=0,5231 para a variável treinamento físico e teste F= 3,90, p=0,4652 para a variável terapia ultrassônica (TNF-alfa) e teste K-W=3,589, p=0,3094 (IL-6).. .....95

Figura 16 - Número de macrófagos por adipócito, campo de 40x, nos diferentes grupos experimentais após 10 semanas de treinamento físico ou placebo associado ou não à terapia ultrassônica no tecido adiposo mesentérico (A), teste de K-W= 62,29, p<0,0001, epididimal (B), teste de K-W= 46,50, p<0,0001, retroperitoneal (C), teste de K-W= 3,303, p=0,3473 e subcutâneo (D), teste de K-W=17,31, p=0,0006..96

Figura 17 - Número de estruturas *crown-like* por adipócito, campo de 40x, nos diferentes grupos experimentais após 10 semanas de treinamento físico ou placebo associado ou não à terapia ultrassônica no tecido adiposo mesentérico (A), teste de K-W= 7,589, p=0,0226, epididimal (B), teste de K-W= 8,949, p=0,0300, retroperitoneal (C), teste de K-W= 5,221, p=0,0735 e subcutâneo (D), teste de K-W= 5,605, p=0,1325.. .....98

Figura 18 - Fotomicrografias ilustrativas da imuno-histoquímica para macrófagos no tecido adiposo mesentérico nos grupos NS (A), NU (B), TS (C) e TU (D), no tecido adiposo retroperitoneal nos grupos NS (E), NU (F), TS (G) e TU (H), no tecido adiposo epididimal nos grupos NS (I), NU (J), TS (K) e TU (L), e no tecido adiposo subcutâneo nos grupos NS (M), NU (N), TS (O) e TU (P) em aumento de 40x.....99

Figura 19 - Esquema sobre os efeitos do uso isolado da terapia ultrassônica de alta potência sobre os tecidos adiposos e hepático e o perfil bioquímico-hormonal.....124

Figura 20 - Esquema sobre os efeitos do uso isolado do treinamento físico progressivo de moderada intensidade sobre os tecidos adiposos e hepático e o perfil

bioquímico-hormonal.....125

Figura 21 - Esquema sobre os efeitos da interação da terapia ultrassônica de alta potência com o treinamento físico progressivo de moderada intensidade sobre os tecidos adiposos e hepático e o perfil bioquímico-hormonal.....127

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de <i>primers</i> e condições de amplificação dos genes utilizados na biologia molecular .....	63
Tabela 2 - Massa corporal e índice de Lee dos grupos experimentais UC, US1, US2 e US3.....	70
Tabela 3 - Pressão arterial sistólica antes e após 10 dias de estimulação ultrassônica dos grupos experimentais UC, US1, US2 e US3.....	74
Tabela 4 - Perfil lipídico e metabólico dos grupos experimentais UC, US1, US2 e US3 após 10 sessões de terapia ultrassônica.....	75
Tabela 5 – Associações entre a massa corporal e dos tecidos adiposos subcutâneo abdominal e visceral total dos grupos experimentais US1, US2 e US3.....	76
Tabela 6 - Associações entre a glicose, área sob a curva do teste de tolerância à glicose, insulina e índices de resistência insulínica dos grupos experimentais US1, US2 e US3.....	77
Tabela 7 - Trabalho realizado nos testes de exaustão de ratos machos submetidos à realização ou não de treinamento físico e terapia ultrassônica .....	78
Tabela 8 - Trabalho realizado nos testes de exaustão de ratos machos submetidos à realização ou não de treinamento físico e terapia ultrassônica .....	79
Tabela 9 - Massa (g/100g de massa corporal) dos tecidos adiposos, fígado e glândulas adrenais dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU após a realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica .....	80
Tabela 10 - Associação entre a massa corporal, do tecido adiposo subcutâneo abdominal e visceral total nos grupos experimentais NS, NU, TS e TU .....	80
Tabela 11 - Volume dos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica.....	81
Tabela 12 - Elipticidade dos adipócitos nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica .....	82

Tabela 13 - Estimativa do número de adipócitos nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica .....	83
Tabela 14 - Expressão gênica do receptor $\beta_3$ -adrenérgico e proteína quinase A nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica .....	87
Tabela 15 - Correlação de Pearson entre a expressão gênica do receptor $\beta_3$ -adrenérgico e PKA e entre HSL, PKA, as massas dos tecidos adiposos mesentérico, epididimal e subcutâneo e ácidos graxos livres nos grupos experimentais NS, NU, TS e TU .....	88
Tabela 16 - Expressão gênica da lipase hormônio sensível (HSL) e lipase de triglicerídeos (ATGL) nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica .....	89
Tabela 17 - Expressão gênica da lipoproteína lipase (LPL) nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica.....	90
Tabela 18 - Correlação de Pearson entre a insulina plasmática e a expressão gênica da HSL e LPL no TASC dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU .....	90
Tabela 19 - Perfil bioquímico-metabólico dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica.....	92
Tabela 20 - Perfil hormonal após realização ou não do treinamento físico e de terapia ultrassônica.....	93
Tabela 21 - Correlação de Pearson entre a testosterona total e o cortisol, insulina plasmática, massa e expressão gênica de HSL no TASC, TNF- $\alpha$ no TAME dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU.....	93
Tabela 22 - Correlação de Pearson entre a insulina plasmática e IL-6 plasmática e número de macrófagos infiltrados no TASC dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU.....	94
Tabela 23 - Expressão gênica de IL-6 e TNF-alfa nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica .....	101



Tabela 24 – Associações entre IL-6 plasmática e a expressão gênica de IL-6 no tecido adiposo branco e entre a expressão gênica de TNF- $\alpha$ e o número de macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU .....	102
Tabela 25 – Associações entre a expressão gênica de IL-6 e macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco e insulina plasmática do grupo experimental NU .....	103
Tabela 26 - Correlação de Pearson entre a massa dos depósitos adiposos e a respectiva expressão gênica de IL-6 e TNF-alfa dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU .....	103
Tabela 27 – Associações entre a expressão gênica de TNF- $\alpha$ no tecido adiposo branco e insulina plasmática do grupo experimental TU .....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

11 $\beta$ -HSD1	11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo I
AC	Adenilato ciclase
ACC	Acetil CoA carboxilase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AD	Adrenais direita e esquerda
AGL	Ácidos graxos livres
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Quinase ativada por AMP
ATGL	Lipase de triglicerídeo
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
C/EBPs	Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDS	Regiões codificadoras
CR	Receptores de citocinas
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ERA	Área de radiação efetiva
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FABP4	Proteína do tipo 4 ligadora de ácidos graxos
FAS	Sintase de ácidos graxos
G	Concentração plasmática de glicose basal
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GLUT4	Transportadores de glicose do tipo 4
GLUTs	Proteínas translocadoras específicas
Gs	Proteína alfa estimulatória ligada a guanina trifosfato
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade
HOMA- $\beta$	Índice de capacidade funcional das células beta
HOMA-IR	Modelo de avaliação de homeostase da resistência à insulina

HSL	Lipase hormônio sensível
I	Concentração plasmática de insulina basal
IC	Intervalo de confiança
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IMC	Índice de massa corporal
IRS	Substrato do receptor de insulina
IRS-1	Substrato-1 do receptor de insulina
IRS-2	Substrato-2 do receptor de insulina
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LDH	Lactato desidrogenase
LDL-c	Lipoproteínas de baixa densidade
<i>Lee Index</i>	Índice de obesidade para roedores
LH	Hormônio luteinizante
LogAGL	Log ácidos graxos livres
LogG	Log glicemia
LogI	Log insulina
LPL	Lipoproteína lipase
M1	Macrófagos regulatórios do tipo 1
M2	Macrófagos regulatórios do tipo 2
MAG	2-monoacilglicerol
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MG	Massa estimada de gordura de um adipócito
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
NA	Comprimento nasoanal
NAD+	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida
NADH	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzida
NFkB	Fator nuclear kappa B
NLRs	Receptores <i>NOD-like</i>
NO	Óxido nítrico

NS	Ratos não treinados e sem ultrassom
NU	Ratos não treinado e com ultrassom
p38MAPK	Proteína quinase p38 ativada por mitógeno
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia polimerase
PDE3B	Fosfodiesterase 3B
PDK-1	Proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítídeos
PGC-1 $\alpha$	Coativador 1 alfa do receptor ativado por peroxissomo proliferador
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP3	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PKA	Proteína quinase do tipo A
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase do tipo C
PPAR $\gamma$	Receptor do tipo gama ativado por peroxissomo proliferador
QUICKI	<i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i>
QUICKI-R	<i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i> - revisado
RLU	Unidades de luz relativas
RT	Retro-transcrição
RT-PCR	Transcrição reversa-reação em cadeia polimerase
SHBG	Proteínas ligadas aos hormônios sexuais
SREBP-1c	Proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
TAB	Tecido adiposo branco
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAG	Triacilglicerol
TAMAR	Tecido adiposo marrom
TAME	Tecido adiposo mesentérico
TAR	Tecido adiposo retroperitoneal
TASC	Tecido adiposo subcutâneo abdominal
TAV	Tecido adiposo visceral total
TE	Teste de exaustão
TLR	Receptores <i>toll-like</i>
TLR2	Receptor toll-like tipo 2
TLR4	Receptor toll-like tipo 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

TS	Ratos treinados e sem ultrassom
TU	Ratos treinados e com ultrassom
UC	Terapia ultrassônica controle
UCP1	Enzimas desacopladoras da mitocôndria do tipo 1
UCP2	Enzimas desacopladoras da mitocôndria do tipo 2
UCP3	Enzimas desacopladoras da mitocôndria do tipo 3
US1	Terapia ultrassônica de $1\text{W}/\text{cm}^2$
US2	Terapia ultrassônica de $2\text{W}/\text{cm}^2$
US3	Terapia ultrassônica de $3\text{W}/\text{cm}^2$
UTR	Regiões não tradutoras
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1 O tecido adiposo .....	27
2.2 Exercício físico .....	35
2.3 Terapia ultrassônica .....	38
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Objetivo Geral .....	43
3.2 Objetivos Específicos .....	43
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1 Animais .....	44
4.2 Procedimento experimental.....	45
4.2.1 Ambientação à corrida em esteira .....	45
4.2.2 Aclimação dos animais e seleção dos corredores .....	45
4.2.3 Teste de exaustão e avaliação do desempenho físico .....	48
4.2.4 Treinamento físico na esteira .....	49
4.2.5 Estudo piloto para a determinação da potência média a ser utilizada na terapia ultrassônica .....	50
4.2.6 Estudo experimental de estimulação ultrassônica .....	52
4.3 Mensuração da pressão arterial sistólica.....	53
4.4 Composição corporal e índice de obesidade .....	54
4.5 Teste de tolerância à glicose.....	54
4.6 Eutanásia dos animais .....	55
4.7 Perfil bioquímico-metabólico e hormonal.....	56
4.7.1 Dosagem dos ácidos graxos .....	56
4.7.2 Dosagem da glicose .....	56
4.7.3 Dosagem do HDL-c.....	56
4.7.4 Dosagem do LDL-c .....	57
4.7.5 Dosagem dos triglicerídeos .....	57
4.7.7 Dosagem da insulina e leptina.....	57
4.7.8 Determinação do HOMA-IR e capacidade funcional das células $\beta$ pancreáticas.....	57
4.7.9 Dosagem de estradiol, testosterona e cortisol .....	59
4.8 Perfil inflamatório sistêmico.....	59

4.8.1 Dosagem de IL-6.....	59
4.8.2 Dosagem de Proteína C reativa .....	60
4.9 Reação em cadeia polimerase (PCR) .....	60
4.9.1 Extração de RNAm.....	60
4.9.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) - Transcrição reversa .....	61
4.9.3 Amplificação do cDNA.....	61
4.10 Avaliação histológica do tecido adiposo e do parênquima hepático .....	65
4.10.1 Avaliação histológica do tecido hepático .....	65
4.10.4 Avaliação histológica dos tecidos adiposos .....	65
4.10.5 Gravimetria do tecido adiposo .....	66
4.10.6 Avaliação Imuno-histoquímica dos tecidos adiposos e hepático.....	67
4.11. Análise estatística .....	68
4.11.2 Projeto piloto para a determinação da potência média da terapia ultrassônica.....	68
4.11.2 Estudo experimental.....	68
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
5.1 Projeto piloto para determinação da potência média .....	70
5.1.1 Massa corporal e índice de Lee.....	70
5.1.2 Massa de TAME, TAE, TAR e TASC.....	71
5.1.3 Análise morfométrica dos tecidos adiposos.....	73
5.1.4 Pressão arterial sistólica.....	74
5.1.5 Perfil lipídico e metabólico .....	74
5.1.6 Correlações.....	76
5.2 Treinamento físico associado ou não a terapia ultrassônica .....	77
5.2.1 Trabalho realizado nos testes de exaustão .....	77
5.2.2 Massa corporal e índice de Lee.....	78
5.2.3 Massa dos tecidos adiposos mesentérico, epididimal, retroperitoneal, subcutâneo abdominal, visceral total e marrom .....	79
5.2.4 Análise morfométrica dos tecidos adiposos.....	81
5.2.5 Perfil lipolítico e lipogênico dos tecidos adiposos .....	86
5.2.6 Perfil bioquímico-metabólico e hormonal.....	91
5.2.7 Perfil inflamatório sistêmico e hepático.....	94
5.2.8 Perfil inflamatório dos tecidos adiposos.....	96
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>105</b>
6.1 Projeto piloto .....	105
6.2 Treinamento físico associado ou não a terapia ultrassônica .....	107

<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>128</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>129</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Na sociedade contemporânea observa-se o aumento de indivíduos com sobrepeso (Índice de massa corporal -  $IMC \geq 25\text{kg/m}^2$ ) e obesos (Índice de massa corporal -  $IMC \geq 30\text{kg/m}^2$ ), sendo estimado para o ano de 2015 no Brasil, uma prevalência de 63% e 24%, respectivamente, de pessoas com sobrepeso e obesidade entre 15 e 100 anos de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Associada a este perfil epidemiológico, percebe-se uma transformação de hábitos na juventude e em outras fases da vida com a adoção de formas de consumo de bens, serviços e estilos de vida saudáveis (DEBERT, 2010), entre eles a atividade física (HASHIMOTO; SATO; IEMITSU, 2013) e os procedimentos estéticos (MIWA et al., 2002) com o fim de se conseguir um corpo ideal ou padrão.

O perfil de corpo padrão no mercado global e, especificamente, no Brasil atual, está associado com baixos percentuais de gordura, poucas curvas e corpo definido (GOLDENBERG, 2007). O modelo corporal padrão é almejado devido motivos sociais (SCHLÖSSER; CAMARGO, 2015), psicológicos, (HENDERSON-KING; BROOKS, 2005) e também pela busca de minimizar possíveis alterações fisiológicas no organismo.

Neste sentido, existem procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos para satisfazer as novas necessidades de consumo. Entre os procedimentos de cirurgia estética no Brasil, destacam-se as técnicas de lipoaspiração e abdominoplastia (INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY, 2014). Entretanto, um estudo apontou que a maioria das mulheres submetidas às cirurgias plásticas no abdome não estão com sobrepeso ou obesidade (COELHO, 2013). Assim, percebe-se que existe uma grande proporção de pessoas eutróficas que buscam procedimentos estéticos para a redução de medidas corporais.

O Brasil ocupa o segundo lugar em relação aos procedimentos estéticos não cirúrgicos realizados no mundo (INTERNATIONAL SOCIETY OF AESTHETIC PLASTIC SURGERY, 2014), sendo que as intervenções para a redução da gordura corporal estão entre os onze tipos mais procurados (RESOURCES & EDUCATION, 2014). Porém, em algumas situações, essas intervenções são oferecidas para a

população, sem evidências científicas prévias e suficientes em relação aos parâmetros a serem utilizados e os efeitos colaterais associados.

O ultrassom terapêutico, por exemplo, é um recurso utilizado há bastante tempo com fins anti-inflamatório, cicatrizante (DE DEYNE; KIRSCH-VOLDERS, 1995) e analgésico (MORASKA et al., 2013), mas que, atualmente, passou a ser utilizado para a redução das medidas corporais (MIWA et al., 2002). A aplicação do ultrassom no modo pulsado estimula a lipólise no tecido adiposo de ratos por meio do aumento da secreção de norepinefrina no nervo simpático da região do corpo irradiada pelo ultrassom, determinando redução de volume corporal local e liberação de ácidos graxos e glicerol (MIWA et al., 2002). Alterações histológicas nos adipócitos e retração das fibras colágenas de humanos decorrentes dos efeitos cavitacionais do ultrassom também foram observadas após o uso do ultrassom pulsado a 2 e 3MHz e potência, alta, de  $3W/cm^2$  (FERRARO et al., 2008).

Considerando-se a frequência de 3MHz utilizada no ultrassom com fins lipolíticos, a qual limita a penetração das ondas ultrassônicas a uma profundidade de meio valor em torno de 17mm (DOWSETT; KENNY; JOHNSTON, 2006), espera-se que os efeitos lipolíticos em ratos eutróficos atinjam o tecido adiposo subcutâneo, o qual contribui com a maior parte dos ácidos graxos para a circulação sistêmica. Essa situação sugere que a estimulação ultrassônica na região abdominal pode estar relacionada com o aumento sistêmico de ácidos graxos e com o consequente aumento do risco de alteração da sensibilidade insulínica e do perfil bioquímico em ratos *Wistar* saudáveis (GONÇALVES et al., 2009a).

A terapia ultrassônica de baixa intensidade determina a liberação de ácidos graxos em ratos *Wistar* saudáveis (KOGURE et al., 2005) e citocinas inflamatórias em macrófagos *in vitro* (TURNER, 2009) que podem ativar serinoquinases e complexos quinases responsáveis por produzir estresse oxidativo e interferir na sinalização da insulina (ARKAN et al., 2005; VALLERIE et al., 2008). Além disso, a liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas podem ativar macrófagos residentes e linfócitos T no tecido adiposo (SAMAAAN, 2011), como ocorreu após o uso da terapia ultrassônica de alta intensidade em que houve o aumento da infiltração de macrófagos e linfócitos no tecido adiposo da região abdominal tratada (SHALOM et al., 2013).

Similarmente à terapia ultrassônica, o treinamento físico de *endurance* de intensidade moderada é um recurso lipolítico não cirúrgico potencial para a redução de estoques corporais de tecido adiposo por meio do aumento dos níveis de catecolaminas. Entretanto, o treinamento físico de *endurance* de intensidade moderada reduz os níveis plasmáticos de insulina, inibe as quinases responsáveis pelo desenvolvimento da resistência à insulina, limita o movimento de células mononucleadas responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias para o tecido adiposo (GLEESON et al., 2011).

A associação do treinamento físico com a terapia ultrassônica de baixa potência, em homens saudáveis, reduziu a espessura do tecido adiposo na região interna da coxa, algo que não ocorreu com a realização apenas de caminhada (MIWA et al., 2002). Em contrapartida, a associação dessas terapias, em ratos não diabéticos, não influenciou os triglicerídeos plasmáticos e intramusculares, enquanto que em ratos diabéticos, a realização de natação, independente da aplicação ou não de terapia ultrassônica, determinou a redução de triglicerídeos intramusculares e da glicose plasmática (DALIA et al., 2011);

Entretanto, há carência de ensaios experimentais e clínicos relacionados aos efeitos da terapia ultrassônica isolada de alta potência sobre as vias lipolíticas adrenérgicas, as implicações do treinamento físico de *endurance* isolado sobre o perfil inflamatório em modelos animais eutróficos e sobre a associação do treinamento físico com a terapia ultrassônica em regiões abdominais, local em que a realização dessa terapia ocorre de forma prevalente nas clínicas de estética. Além disso, não foram encontradas evidências, em animais ou humanos, sobre os efeitos da associação dessas duas terapias na morfologia dos adipócitos, assim como na possível atenuação dos efeitos colaterais da terapia ultrassônica no perfil bioquímico metabólico, hormonal, inflamatório sistêmico e do tecido adiposo e hepático.

Diante disso, a realização desse estudo em um modelo animal visa verificar em condições de controle constante de temperatura, alimentação, calibração do equipamento de ultrassom, aptidão e treinamento físico, a influência da terapia ultrassônica de alta potência, isolada ou associada com o treinamento físico de *endurance* de moderada intensidade, sobre o perfil metabólico, marcadores lipolíticos e lipogênicos, morfologia e perfil inflamatório dos tecidos adiposos abdominais viscerais e subcutâneo e do fígado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O tecido adiposo

O tecido adiposo possui as enzimas necessárias para a síntese de ácidos graxos e estoque de triglicerídeos (lipogênese) em momentos de aumento da ingestão de nutrientes, assim como as proteínas responsáveis pela mobilização (lipólise) energética quando há déficit calórico (AHIMA; FLIER, 2000). Nos mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAMAR) que são responsáveis, respectivamente, pela homeostase energética do organismo (FONSECA-ALANIZ et al., 2007) e a produção de calor (termogênese) (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Além disso, há o tecido adiposo bege, cujo adipócitos são similares aos do tecido adiposo marrom com alto conteúdo mitocondrial e taxa metabólica, mas que possuem uma morfologia semelhante ao TAB (HARMS; SEALE, 2013).

O TAB é distribuído em vários depósitos na região subcutânea, visceral ou juntos aos músculos (intramuscular). O tecido adiposo subcutâneo (TASC) está localizado sob a pele, enquanto que os viscerais estão intercalados entre os órgãos vitais e podem ser caracterizados como: mesentérico (TAME) que se associa com as alças intestinais e pâncreas; epididimal (TAE), localizado junto com os testículos e com projeções para a região ântero-inferior do abdome; retroperitoneal (TAR), nas margens dos rins e das glândulas adrenais. O TAMAR é encontrado, simetricamente, principalmente, no centro da região interescapular, mas também e em menor quantidade, na região cervical e axilar, e tendem a esbranquiçar com o avançar da idade do animal (VERNOCHET et al., 2009).

O processo de diferenciação do tecido adiposo, denominado adipogênese, se inicia antes do nascimento do organismo vivo (DESNOYERS; VODOVAR, 1977), sendo que após o nascimento ocorre uma expansão rápida do tecido adiposo, por aumento do tamanho (hipertrofia) ou do número (hiperplasia) de adipócitos (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Mudanças no número de adipócitos ocorrem por processos que envolvem proliferação e diferenciação de pré-adipócitos (DE

QUEIROZ et al., 2009). A adipogênese pode ser estimulada por fatores nutricionais, pela atividade física (LIU et al., 2015) ou por fatores hormonais como com os agonistas adrenérgicos (WAN et al., 2014). O controle da adipogênese envolve fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o receptor do tipo gama ativado por peroxissomo proliferador (PPAR $\gamma$ ), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBPs) (AILHAUD; HAUNER, 2004).

O PPAR $\gamma$  está envolvido também no aumento da termogênese, por induzir o aumento da expressão do coativador 1 alfa do receptor ativado por peroxissomo proliferador (PGC-1 $\alpha$ ), o qual é responsável pela regulação da biogênese mitocondrial e da expressão de proteínas mitocondriais no tecido adiposo, músculo esquelético e cardíaco em ratos *Wistar* (HASHIMOTO; SATO; IEMITSU, 2013).

As atividades lipogênicas do TAB são caracterizadas pelos processos metabólicos que resultam em síntese, incorporação e armazenamento de triglicerídeos na gotícula de gordura citoplasmática, enquanto que as atividades lipolíticas se caracterizam por ações que resultam na hidrólise do triglicerídeo armazenado e na liberação de glicerol e três moléculas de AGL (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). As atividades lipolíticas no tecido adiposo podem ser, por exemplo, estimuladas pela leptina, glicocorticoides, catecolaminas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) ou inibidas pela insulina (MIWA et al., 2002; SONI et al., 2004; FONSECA-ALANIZ et al., 2006; LANGIN, 2006). Entre as catecolaminas, a epinefrina e norepinefrina através dos  $\beta$ -adrenoreceptores estimulam a lipólise nos adipócitos (JAWORSKI et al., 2007).

A estimulação dos  $\beta$ -adrenoreceptores (tipos 1, 2 e 3) promove aumento da lipólise por ativação da lipase hormônio sensível (HSL). A HSL hidrolisa o triacilglicerol (TAG) para gerar 2-monoacilglicerol (MAG) que, subsequentemente, requer a lipase monoacilglicerol para completar a lipólise liberando os ácidos graxos livres e glicerol (LANGIN, 2006). Além da HSL, enzimas como a lipase de triglicerídeo (ATGL) e a carboxilesterase 3 também hidrolisam os triglicerídeos (SONI et al., 2004).

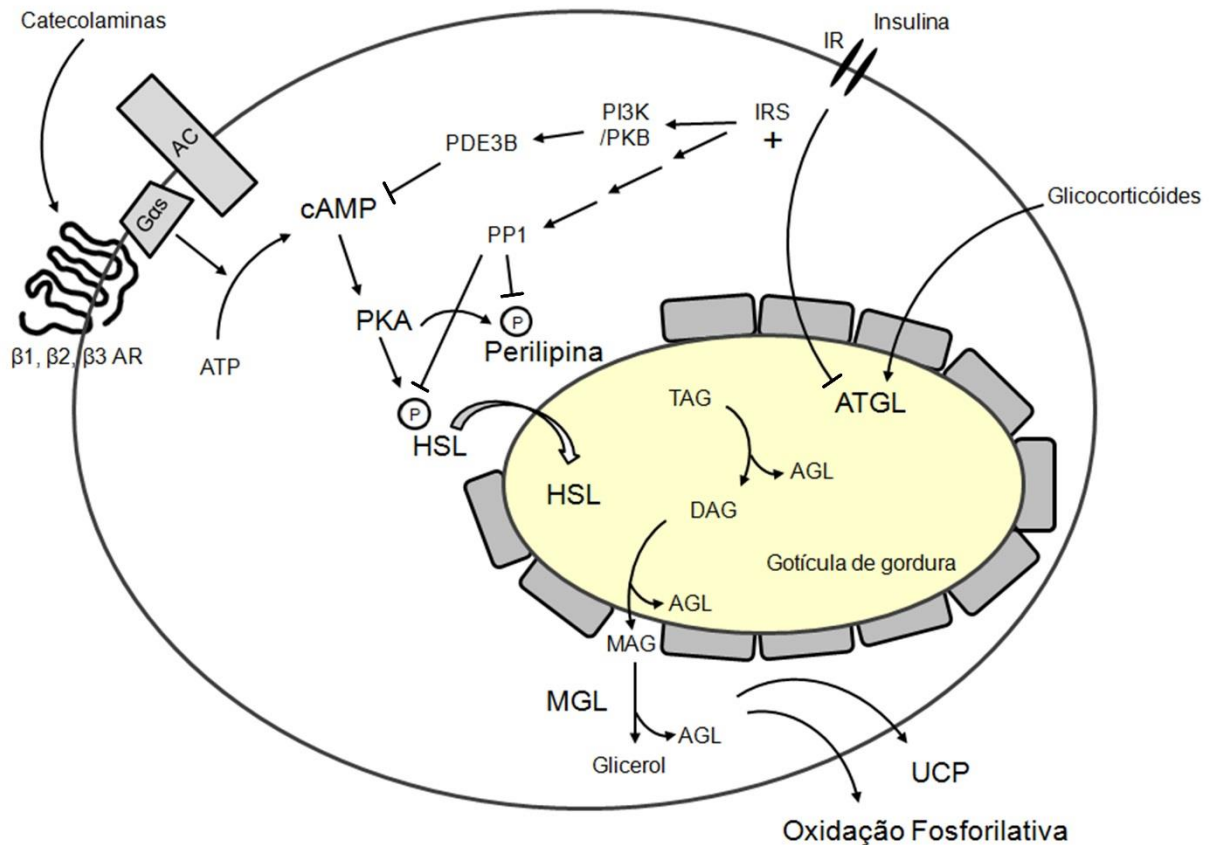
O estímulo a lipólise por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos deve-se a ativação de receptores acoplados a proteína estimulatória ligada a guanina subtipo  $\alpha$ s (Gas)

resultando no aumento da atividade adenilato ciclase. A estimulação da adenilato ciclase leva a um aumento nas concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), resultando na ativação da proteína quinase do tipo A (PKA) dependentes de AMPC. A PKA fosforila a HSL em três resíduos de serina (563, 659 e 660) resultando em aumento da atividade hidrolítica e translocação da HSL do citosol para a superfície da gotícula de gordura (GREENBERG et al., 2001).

A ação hidrolítica da HSL é regulada pela perilipina A, uma proteína associada à gotícula de lipídio. Sob estimulação hormonal, a perilipina A sofre fosforilação pela PKA, desloca-se da superfície das gotículas de gordura e se dispersa pelo citosol, abrindo espaços para o acesso da HSL ao seu substrato, o triglicerídeo (MIYOSHI et al., 2007). Os ácidos graxos formados se ligam a proteínas transportadoras específicas e são liberados no meio extracelular e o glicerol é transportado para o exterior celular por aquagliceroporinas (LEE et al., 2005). A regulação da lipólise nos adipócitos é demonstrada na Figura 1.

O tecido adiposo sofre a influência de vários hormônios como a insulina, hormônios do crescimento, sexuais, tireoidianos, entre outros. Além disso, o tecido adiposo participa da síntese, metabolismo e liberação de hormônios proteicos e esteroides (KERSHAW; FLIER, 2004).

Os glicocorticoides regulam o metabolismo corporal e são sintetizados, principalmente, no córtex adrenal. O corticosterona é o tipo mais potente em roedores e com muitas ações metabólicas que se refletem, principalmente, no estado de jejum, quando os níveis de insulina são menores com concomitante aumento dos níveis séricos de glicocorticoides. Nos adipócitos, os glicocorticoides diminuem a lipogênese que ocorre por inibição da fosforilação da acetil CoA carboxilase (ACC) de modo independente da quinase ativada por AMP (AMPK) (KOLA et al., 2008; GATHERCOLE et al., 2011), assim como pela redução da expressão e atividade da sintase de ácidos graxos (FAS) em roedores (GATHERCOLE et al., 2011). A adrenalina, além de estimular a lipólise em resposta às alterações emocionais e ao estresse físico, também fosforila e ativa a AMPK (OMAR et al., 2009).



**Figura 1** - Regulação da lipólise em adipócitos. O estímulo à lipólise ocorre pela liberação de catecolaminas (via aumento de AMPc) e glicocorticóides, mas é inibido pela ação da insulina. A lipólise é catalisada por 3 lipases: ATGL responsável pela a hidrólise do triacilglicerol (TAG) em diacilglicerol (DAG) e ácido graxo (AGL); lipase hormônio sensível (HSL) que catalisa a hidrólise de TAG, DAG e monoacilglicerol (MAG); lipase de monoacilglicerol (MGL) que catalisa a hidrólise de MAG para formar glicerol e ácido graxo. AMPc= adenosina monofosfato cíclico; ATGL= lipase de triglicerídeos; AC: adenilato ciclase; G $\alpha$ s: proteína alfa estimulatória ligada a guanina trifosfato; PDE3B: fosfatidilesterase 3B; IRS= Substrato do receptor de insulina; PI3K= fosfatidilinositol-3-quinase; PKB= proteína quinase do tipo B; PKA= proteína quinase do tipo A; PP1= proteína fosfatase 1; UCP= Enzimas desacopladoras das mitocôndrias. Adaptado de Jaworski et al. (2007).

Os hormônios sexuais, estrógenos e andrógenos também desempenham um papel importante na regulação do metabolismo lipídico (PASQUALI, 2006). Enquanto a testosterona reduz o tamanho dos adipócitos do tecido adiposo visceral total (TAV) (ABDELHAMED et al., 2015) e inibe a secreção da leptina, os estrógenos possuem efeitos estimulatórios sobre essa adipocina, sintetizada principalmente no TASC (PINILLA et al., 1999). A leptina limita o armazenamento de gordura, não somente pela inibição da ingestão alimentar, mas também por inibir a lipogênese hepática e no tecido adiposo (RAMSAY, 2003) e aumentar a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (KAKUMA et al., 2000).

A insulina possui efeito anabólico, promovendo o armazenamento (lipogênese) e inibindo a liberação de energia (lipólise). A insulina estimula a lipogênese por diferentes mecanismos, entre eles, destaca-se: o estímulo de captação de glicose através de uma via de sinalização dependente do fosfatidilinositol-3-quinase que envolve a ativação da proteína quinase B (PKB) e recrutamento de transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) para a membrana plasmática, de modo a fornecer substrato para a síntese de novas moléculas de ácidos graxos; o bloqueio da inibição da lipogênese induzida pela AMPK via ativação da PKB que fosforila e ativa a fosfodiesterase 3B (PDE3B) com posterior hidrólise do AMPc a 5'AMP inativo, diminuindo a ativação da PKA e portanto, reduzindo a inibição da ACC (GATHERCOLE et al., 2013), assim como a fosforilação da HSL e perilipina (JAWORSKI et al., 2007).

A insulina exerce suas ações fisiológicas nos tecidos via ativação de uma cascata de eventos de sinalização intracelular. Ao ligar-se ao seu receptor desencadeia a sua autofosforilação em resíduos de tirosina, assim como dos seus substratos, incluindo o substrato do receptor de insulina (IRS). Em seguida, a fosforilação de resíduos do IRS em tirosina cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src-2, entre elas, destaca-se a subunidade regulatória p85 do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) que subsequentemente, ativa a subunidade catalítica p110 do PI3K, que por sua vez, catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos, produzindo segundos mensageiros como o fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3) (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004; KALUPAHANA; MOUSTAID-MOUSSA; CLAYCOMBE, 2012).

Adicionalmente, o PIP3 pode ativar a proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítídeos (PDK-1), que ativa a PKB ou mesmo fosforilar a proteína quinase do tipo C (PKC). Além disso, a fosforilação de pequenas GTPases Rab e inativação da AS160 por Akt inicia a reorganização do citoesqueleto, o que resulta na translocação do GLUT4 dentro da membrana celular e facilita a entrada da glicose. A Akt também inibe a transcrição de vários genes envolvidos na gliconeogênese via os fatores de transcrição *forkhead box* e induz genes glicolíticos e lipogênicos por ativar a SREBP-1C e a glicoquinase (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004; KALUPAHANA; MOUSTAID-MOUSSA; CLAYCOMBE, 2012).

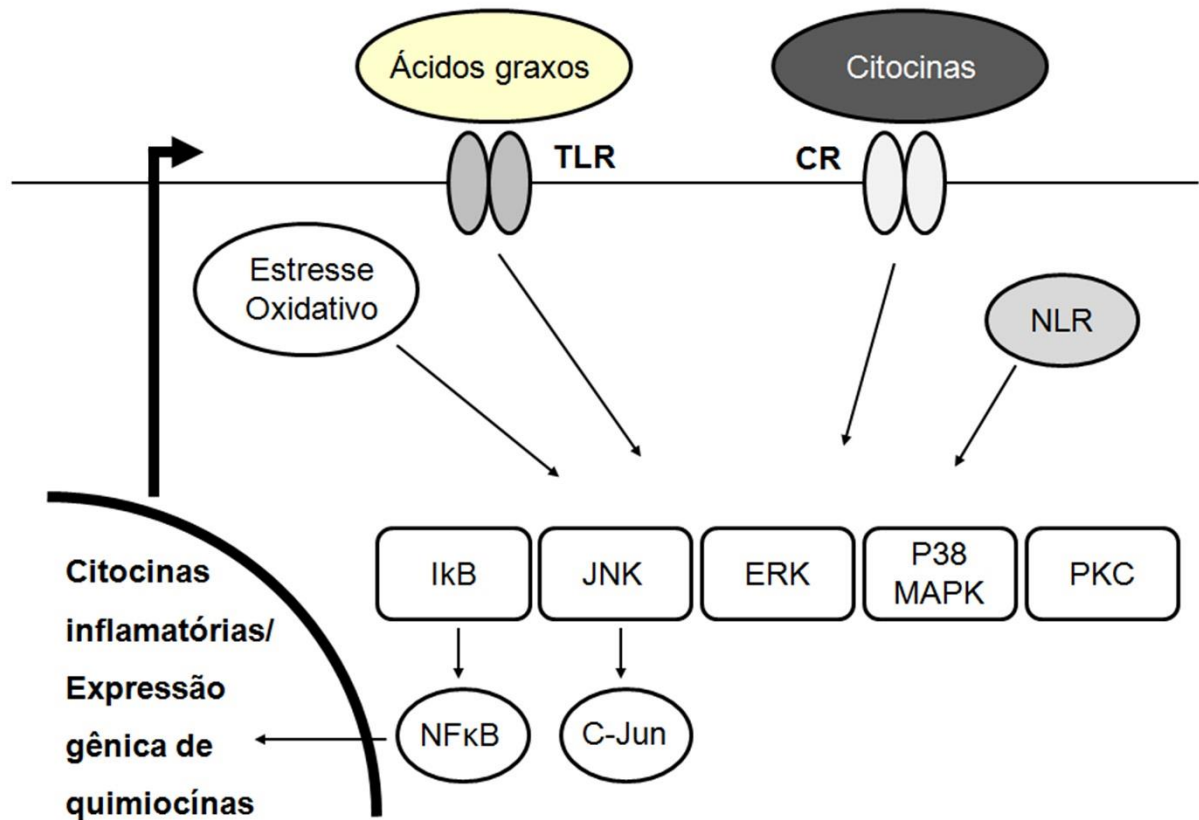


Alterações da cascata de sinalização da insulina estão associadas com a inflamação tecidual. A inflamação mediada por aumento da produção de citocinas inflamatórias e excesso de ácidos graxos livres via ativação dos seus receptores específicos, respectivamente, denominados receptores de citocinas (CR) e receptores *toll-like* do tipo 2 (TLR2) e 4 (TLR4) (SENN, 2006) ativa mecanismos de sinalização que envolvem membros das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK). Entre essas proteínas, inclui-se a C-Jun N-terminal kinase (JNK), a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a proteína quinase p38 ativada por mitógeno (p38MAPK) (ARKAN et al., 2005). Além dessas, a I $\kappa$ B quinase (ARKAN et al., 2005; VALLERIE et al., 2008) e a PKC (HAASCH et al., 2006) são também ativadas. A ativação dessas vias determina a translocação de fatores de transcrição nuclear, incluído o fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) e C-Jun para o núcleo, onde se ligam a sequências específicas de genes promotores e estimulam a transcrição de genes de quimiocinas e citocinas inflamatórias que levam à resistência à insulina (SAMAAN, 2011), como ilustrado na figura 2.

A resistência à insulina é caracterizada por alterações em diversos pontos nas vias de sinalização desse hormônio, tais como: redução da concentração e da atividade quinase do receptor, da concentração e da fosforilação do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) e substrato-2 do receptor de insulina (IRS-2), da atividade da PI3K, da translocação das proteínas translocadoras específicas (GLUTs) e da atividade das enzimas intracelulares (PESSIN; SALTIEL, 2000). Essas alterações podem ocorrer, simultaneamente, com a manutenção da ativação normal da via mitogênica, representada pela MAPK, responsável pelo controle da proliferação e diferenciação celular (ZECCHIN et al., 2003) que é sensível à insulina após a fosforilação das proteínas IRS (BOULTON et al., 1991)

O aumento na liberação de citocinas no TAV e TASC também ativa as células inflamatórias presentes no tecido adiposo, predominantemente linfócitos T e macrófagos regulatórios, do tipo 1 (M1) (HUBER, 2008), aumenta o número de macrófagos pela diferenciação dos monócitos que migram para o tecido adiposo (LUMENG et al., 2007; LUMENG et al., 2008) ou mesmo origina macrófagos a partir de pré-adipócitos (KOSTELI et al., 2010). Estruturas formadas por três ou mais macrófagos ao redor de um adipócito necrótico são denominadas como *crown-like*, as quais englobam os adipócitos e fundem-se para formar células gigantes

multinucleadas contendo lipídios, descritas em camundongos (CINTI et al., 2005; ALTINTAS et al., 2011).



**Figura 2** - Ácidos graxos e citocinas utilizam mecanismos de sinalização similares para ativar a resposta inflamatória na obesidade. Ácidos graxos saturados via receptores *toll-like* (TLR) e citocinas via receptores de citocinas (CR) ativam as enzimas MAPK, incluindo a JNK, ERK e p38MAPK junto com a IκB quinase e PKC. Outros mecanismos incluem a ativação desses caminhos pelos receptores *NOD-like* (NLRs), produção de espécies reativas ao oxigênio e estresse oxidativo e do retículo endoplasmático. A ativação dessas enzimas leva a produção de fatores de transcrição kappa B (NFκB) e C-Jun que entram no núcleo e se ligam a sequências específicas dos genes promotores e levam a transcrição de citocinas inflamatórias. MAPK= proteína quinase ativada por mitógeno; JNK= C-Jun N-terminal kinase; ERK= quinase regulada por sinal extracelular; p38MAPK= proteína quinase p38 ativada por mitógeno; PKC= proteína quinase do tipo C. Adaptado de Samaan (2011).

A infiltração de macrófagos do tipo M1 no tecido adiposo aumenta a secreção de citocinas e quimiocinas inflamatórias destas células, o que proporciona a atração de mais linfócitos T, neutrófilos e monócitos (ELGAZAR-CARMON et al., 2008; LUMENG; MALLARD; SALTIEL, 2009). Por conseguinte, o que inicialmente era um processo inflamatório local, excede a capacidade do tecido adiposo de conter e então, citocinas e ácidos graxos livres são liberados na circulação sanguínea e

alcançam órgãos metabólicos como o fígado e músculo esquelético (GUILHERME et al., 2008; KOSTELI et al., 2010). A deposição de gordura no fígado desencadeia esteatose hepática com subsequente ativação de sinais inflamatórios, secreção de citocinas, atração de monócitos e geração de macrófagos que por sua vez ocasiona inflamação hepática e resistência à insulina (VAN HERPEN; SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008). Os níveis de lipídios hepáticos na obesidade podem ser reduzidos com a realização de treinamento físico em camundongos (VIEIRA et al., 2009), mesmo na ausência de redução da massa corporal em humanos (KEATING et al., 2015).

Além disso, a resistência à insulina ocasiona aumento da gliconeogênese hepática, captação de glicose no músculo esquelético, levando à hiperglicemia. Como compensação para a hiperglicemia relativa, inicialmente, as células  $\beta$  pancreáticas aumentam a produção de insulina, entretanto, a hipersecreção e resistência à insulina por longo tempo ocasiona a falência do pâncreas, intolerância à glicose e o desenvolvimento de diabetes melitus do tipo 2 (STUMVOL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005).

Durante a resistência à insulina do tecido adiposo, a IL-6 e o TNF- $\alpha$  são secretados em maior quantidade, principalmente, pelos monócitos e macrófagos na corrente sanguínea e matriz do estroma-vascular do TAB, respectivamente (HAUNER, 2004). Na inflamação crônica de baixa intensidade, em que os níveis de IL-6 estão elevados, há resistência insulínica, intolerância à glicose e hiperglicemia de jejum (KNUDSEN et al., 2010; YOON et al., 2010). A IL-6 também estimula a síntese de proteína C reativa no fígado, a qual é um marcador inflamatório de estágio agudo (BLAKE; RIDKER, 2001).

Assim como a IL-6, o TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória e imunomodulatória que inibe a lipogênese e estimula a lipólise em adipócitos aumentando os ácidos graxos livres na circulação. Esta citocina está envolvida na inflamação, apoptose, citotoxicidade, produção de outras citocinas, tais como interleucina-1 (IL-1) e IL-6 e induz a resistência insulínica (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Em humanos obesos existe uma correlação inversa entre TNF- $\alpha$  e o metabolismo da glicose devido à supressão da sinalização insulínica, redução da fosforilação do IRS-1 e da PI3K com redução da síntese e translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana (ARNER, 1995).

A hiperglicemia resultante da resistência à insulina estimula a produção de ácidos graxos pelo fígado via SRBPs, ACC e FAS (ZECCHIN et al., 2004). No fígado, a diminuição da sensibilidade à insulina determina ainda uma menor supressão na síntese de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O resultado do processo é a liberação de um excesso de partículas de VLDL grandes, ricas em triglicerídeos que por sua vez geram uma cascata de eventos de troca que culminam com a redução nos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) (BRITES et al., 2000; PANAROTTO et al., 2002).

## 2.2 Exercício físico

O treinamento físico reduz a massa corporal e adiposa (HASHIMOTO; SATO; IEMITSU, 2013) a inflamação hepática (KAWANISHI et al., 2012; KEATING et al., 2015) e do tecido adiposo (VIEIRA et al., 2009; KAWANISHI et al., 2010) e aumenta a sensibilidade à insulina (EL-KADER; GARI; EL-DEN, 2014).

O aumento da demanda energética durante ou após a realização da atividade física é suprido pelo substrato disponível para o metabolismo celular, sendo a oxidação de carboidratos e ácidos graxos ativada simultaneamente (ARKINSTALL et al., 2004). Entretanto, a maior disponibilidade de um nutriente em detrimento de outro (SPRIET, 2014), assim como a intensidade de realização do exercício físico (DE GLISEZINSKI et al., 2003), pode gerar mudanças na proporção em que carboidratos e ácidos graxos são oxidados. No exercício de *endurance* de intensidade moderada (55 a 65% do  $VO_2\text{max}$ ) (KRAUSE et al., 2014), os ácidos graxos livres são os substratos predominantemente utilizados em humanos (HOROWITZ et al., 2000).

No treinamento de *endurance* de intensidade moderada, a lipólise ocorre mais intensamente no TASC devido a diferenças regionais da função e densidade de receptores adrenérgicos e de insulina em cada tecido adiposo (HOROWITZ, 2003).

O maior estímulo para a ativação da lipólise durante o exercício em humanos é o aumento na secreção de catecolaminas, com subsequente estimulação  $\beta$ -adrenérgica, ativação da HSL (STALLKNECHT et al., 2001) e supressão da insulina plasmática (LAFONTAN et al., 2005). Além disso, a realização de exercício de *endurance* de intensidade moderada determina um pico de atividade da lipase de triglicerídeos (ATGL) no tecido adiposo de camundongos (DUBÉ et al., 2015).

Estudos longitudinais indicam que a mobilização de ácidos graxos plasmáticos após várias semanas de treinamento físico de *endurance* não aumenta (HOROWITZ et al., 2000) e pode até mesmo diminuir (MARTIN et al., 1993) provavelmente, devido a uma supressão da resposta às catecolaminas (HOROWITZ et al., 1999), porém este fato não compromete a oxidação de ácidos graxos. O aumento da oxidação de ácidos graxos sem um aumento concomitante na taxa lipolítica melhora a coordenação entre a disponibilidade de ácidos graxos e a oxidação, limitando a quantidade de ácidos graxos que permanece na circulação sanguínea sem serem oxidados e reduz o acúmulo de lipídios no músculo, evitando, assim, prejuízos na captação de glicose e alterações da sinalização insulínica (HOROWITZ, 2003).

A prática regular de exercício também diminui a concentração de triglicerídeos e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) e aumenta a concentração de HDL-c (KRAUS et al., 2002). Estes efeitos podem ser mediados não somente via a redução na massa de gordura visceral, mas também por indução de um ambiente anti-inflamatório em cada sessão de exercício (PETERSEN; PEDERSEN, 2005; MATHUR; PEDERSEN, 2008).

Em homens diabéticos tipo 2, o treinamento físico diminui a concentração plasmática de IL-6, TNF- $\alpha$ , ao passo que aumenta a secreção de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) por um efeito direto da diminuição da quantidade de gordura armazenada nos depósitos abdominais (HOPPS; CANINO; CAIMI, 2011). Os treinamentos de intensidade baixa e moderada em pacientes diabéticos tipo 2 e obesos reduzem os níveis de TNF- $\alpha$ , proteína C reativa, interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6 e a resistência à insulina, porém o exercício de intensidade moderada diminui mais intensamente esses marcadores (EL-KADER; GARI; EL-DEN, 2014).

O exercício físico pode limitar o movimento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) para o tecido adiposo, pois o estresse gerado pelo

exercício resulta na exposição contínua dessas células com as quimocinas liberadas em concentrações fisiológicas, resultando na internalização dos receptores de quimocinas (MAFFEI et al., 2009), além de haver a redução na expressão dos receptores de PBMCs com um estilo de vida ativo fisicamente (NARA et al., 2007). Além disso, o treinamento com exercício suprime a infiltração de macrófagos M1 (KAWANISHI et al., 2010). Estudos sobre treinamento com exercício em humanos demonstraram que os monócitos têm uma redução da expressão de TLR4 por várias horas após o exercício prolongado intenso, associada com a diminuição da inflamação e a produção de citocinas (FLYNN; MCFARLLIN, 2006).

A realização de exercício físico também promove alterações hormonais que sofrem variações de acordo com a modalidade e a intensidade do treinamento, sendo que os exercícios de resistência muscular aumentam os hormônios esteroidais, enquanto que o treinamento de *endurance* de alta intensidade aumenta menos pronunciadamente (TREMBLAY; COPELAND; VAN HELDER, 2004). Em exercícios realizados por pessoas com consumo máximo de oxigênio maior que 60% do  $VO_{2máx}$ , a secreção de cortisol e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é proporcional a intensidade do exercício (BARBOZA et al., 2012), sendo que em exercícios de intensidade baixa e moderada, as concentrações de cortisol são ligeiramente alteradas (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000).

A elevação dos níveis plasmáticos de cortisol e hormônio do crescimento são alguns dos mecanismos responsáveis pela elevação da concentração da glicose sanguínea após a realização de exercícios de alta intensidade (DEL CORRAL et al., 1998). Além disso, o cortisol, o hormônio do crescimento e as catecolaminas estimulam a lipólise durante o exercício e conseqüentemente, aumentam a concentração de AGL imediatamente após e em 1 a 2 horas de recuperação do exercício de intensidade moderada. Exercício físico de intensidade moderada também suprime a liberação de insulina durante o período de recuperação (PEAKE et al., 2014).

O aumento transitório dos níveis de testosterona durante o exercício está associado ao aumento nas concentrações séricas das proteínas ligadas aos hormônios sexuais (SHBG) (ZMUDA; THOMPSON; WINTERS, 1996). As evidências sugerem que a elevação dos níveis plasmáticos de testosterona em ratos machos é associada à elevação dos níveis de lactato durante o exercício. Pelo menos em

parte, isso ocorre por um efeito estimulatório direto do lactato e independente do hormônio luteinizante (LH) sobre o AMPc testicular que favorece a liberação de testosterona (LU et al., 1997).

O treinamento físico reduz, ainda, os níveis plasmáticos de leptina, os quais são responsivos ao conteúdo de gordura, principalmente do TASC, assim como pela resposta direta do fator treino (ZOTH et al., 2010). A redução na expressão de leptina no tecido adiposo após a realização de exercícios parece ocorrer por um mecanismo dependente da liberação de AMPc subsequente a ação da norepinefrina sobre os receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos (BRAMLETT et al., 1999).

### **2.3 Terapia ultrassônica**

Além da realização de exercícios físicos para a redução do excesso de massa corporal, outros procedimentos alternativos não-cirúrgicos envolvem mudanças na dieta, sessões de mesoterapia, laserterapia (GRAZER; JONG, 2000) e a terapia ultrassônica (BROWN et al., 2009). Apesar de o ultrassom ser utilizado principalmente como recurso diagnóstico, por ser indolor e não invasivo (SHALOM et al., 2013; NASSAR et al., 2015) ele também é empregado, em baixas intensidades, como recurso terapêutico em processos inflamatórios e dolorosos e lesões musculoesqueléticas (ROBERTSON; BAKER, 2001), assim como em altas potências para o tratamento de tumores (SAEDI; KAMINER, 2013) e redução de medidas corporais (MIWA et al., 2002; SHEK et al., 2014).

As variações na forma de emissão da onda ultrassônica são utilizadas para diferentes finalidades terapêuticas. A tensão através do transdutor do ultrassom pode ser aplicada de forma contínua durante todo o tempo de tratamento ou em rajadas (modo pulsado). No modo pulsado, o regime do pulso pode ser descrito pelos valores dos tempos ligado e desligado, relação entre o tempo ligado e o desligado e em valor percentual do tempo ligado em relação ao tempo ligado mais desligado (HAAR, 2009). Devido à emissão em pulsos ou rajadas, no ultrassom pulsado há uma redução da potência média, em  $watts/cm^2$  ( $W/cm^2$ ) num determinado período e conseqüentemente, há diminuição da quantidade de energia disponível para aquecer os tecidos. Isso significa que alguns efeitos mecânicos

decorrentes do estresse tecidual ainda sejam produzidos, mas efeitos térmicos diretos permaneçam reduzidos (ROBERTSON et al., 2009).

As distintas potências de emissão das ondas sonoras do aparelho de ultrassom resultam em efeitos diferentes no tecido subjacente. Baixas potências (menores do que  $1\text{W}/\text{cm}^2$ ) implicam em efeitos de cicatrização celular em condrócitos de aves (ZHANG et al., 2003), altas potências ( $1$  a  $10\text{W}/\text{cm}^2$ ) podem induzir apoptose em células cancerígenas humanas (FANG et al., 2007). Em um estudo comparativo entre ultrassom focado com potência de  $1,8\text{W}/\text{cm}^2$  e  $2,5\text{W}/\text{cm}^2$ , a estimulação de  $2,5\text{W}/\text{cm}^2$  foi mais eficiente na redução da massa corporal, liberação de gordura, na alteração da estrutura histológica e apoptose no tecido adiposo humano (PALUMBO et al., 2011).

Quando penetra no corpo, o ultrassom exerce efeitos sobre as células e os tecidos por meio de dois mecanismos físicos: térmicos e atérmicos ou mecânicos. Os efeitos térmicos são gerados quando o ultrassom passa através dos tecidos e uma porcentagem é absorvida, gerando calor dentro desse tecido. Entretanto, a quantidade de energia absorvida depende da natureza do tecido (tecidos com alto conteúdo de proteínas absorvem mais do que alto teor de gordura), do seu grau de vascularização e da frequência do ultrassom aplicado (quanto maior a frequência, maior a absorção) (ROBERTSON et al., 2009; HAAR, 2009).

Além da ablação térmica, os adipócitos são susceptíveis aos efeitos atérmicos do ultrassom, os quais são associados aos mecanismos físicos de cavitação, correntes acústicas e ondas estacionárias (ROBERTSON et al., 2009). A cavitação ocorre somente com altas potências de emissão ultrassônica e é descrita como a formação, oscilação, crescimento e colapso de bolhas de gás micrométricas nos tecidos como resultado da vibração do ultrassom (NYBORG, 2001). As altas pressões na região externa e altas temperaturas internamente nas bolhas forçam o colapso das mesmas e podem causar apoptose celular por meio desse processo mecânico em células cancerígenas (DUBINSKY et al., 2008).

Brown e colaboradores (2009) observaram a formação de cavitações no tecido adiposo de suínos e destruição mecânica de adipócitos com preservação do tecido conjuntivo e dos vasos na área tratada com a utilização de ultrassom pulsado na potência de  $4\text{W}$ . Em cortes histológicos, foram observadas alterações de adipócitos e retração das fibras colágenas após o uso do ultrassom com frequências de  $2$  e



3MHz e uma potência máxima de 3 W/cm<sup>2</sup> (FERRARO et al., 2008). Isso é condizente com a presença de espaços vazios, rupturas e diminuição dos espaços extracelulares decorrentes da formação de bolhas de ar pela emissão ultrassônica em intervalos similares de potência (TER HAAR, 2012).

O ultrassom também desencadeia efeitos lipolíticos no tecido adiposo por meio do aumento da secreção de norepinefrina pelas terminações nervosas simpáticas da região do corpo irradiada, gerando redução de volume corporal local (MIWA et al., 2002) e liberação de ácidos graxos (MIWA et al., 2002; KOGURE et al., 2005).

Resultados controversos são apresentados em relação aos efeitos lipolíticos do ultrassom sobre o perfil bioquímico e metabólico. Moreno-Moraga e colaboradores (2007) verificaram que o uso do ultrassom gerou a redução da espessura da gordura subcutânea, sem alterar a deposição de gordura no fígado e os valores do colesterol total, mas com aumento dos triglicerídeos plasmáticos em adultos saudáveis. Gonçalves e colaboradores (2009a) observaram que a utilização do ultrassom promoveu alteração do perfil bioquímico, diminuição na sensibilidade à insulina, redução da ingestão alimentar, do peso corporal e dos depósitos de gordura retroperitoneal e inguinal em ratos saudáveis. Jewell, Desilets e Smoller (2011) não observaram alterações nos níveis das enzimas hepáticas, ácidos graxos livres ou colesterol em porcos após terapia ultrassônica focada de alta potência. Da mesma forma, não foram encontradas mudanças no perfil lipídico, marcadores inflamatórios, renais ou de função hepática após o uso de ultrassom focado no abdome e flancos de indivíduos adultos saudáveis (JEWELL et al., 2012)

O uso do ultrassom também foi associado com aumento na concentração plasmática da proteína C reativa, enzima lactato desidrogenase (LDH) e desenvolvimento de hiperglicemia aguda em ratos *Wistar* saudáveis (GONÇALVES et al., 2009b). Como visualizado em TASC de humanos saudáveis, a resposta inflamatória promovida pelo ultrassom pode ser decorrente da lesão dos adipócitos, que induz a liberação de sinais quimiotáticos com posterior atração de macrófagos, linfócitos, leucócitos polimorfonucleares para a área tratada (SHALOM et al., 2013).

Em um estudo comparativo da expressão gênica de citocinas após punção de tecido de úlceras varicosas tratadas por 4 meses com sessões semanais de terapia ultrassônica de baixa potência, verificou-se a diminuição do TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8,

IL-11 e aumento de IL-10 (ESCANDON et al., 2012), assim como em estudo clínico prospectivo com 3 sessões semanais de ultrassom por 5 semanas em úlceras diabéticas (YAO et al., 2014). Análises da expressão gênica de TNF- $\alpha$ , imediatamente, após a aplicação de ultrassom a 30mW/cm<sup>2</sup> durante 3 minutos por 6 dias em tecido adiposo abdominal humano *in vitro*, demonstraram valores menores do que no grupo controle (PARK et al., 2010). Entretanto, em potências de 0,1 a 0,4W/cm<sup>2</sup> por 5 minutos, a terapia ultrassônica aplicada em fibroblastos e osteoblastos *in vitro*, não alterou os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-6, mas aumentou ligeiramente os níveis de IL-1 $\beta$  (DOAN et al., 1999).

Também em baixas potências, 1W/cm<sup>2</sup>, a terapia ultrassônica com frequência de 1MHz aumentou a expressão gênica de enzimas desacopladoras da mitocôndria do tipo 2 (UCP2) e tipo 3 (UCP3) no músculo gastrocnêmio por mecanismos diferentes dos ocasionados pelo treinamento físico (KOGURE et al., 2005). Esses resultados sobre o músculo na região estimulada pelo ultrassom podem ser decorrentes dos postulados da Lei de Grotthus-Draper, os quais afirmam que a energia sonora é pouco absorvida em tecidos pobres em água. Assim, um percentual considerável da onda atravessa o tecido adiposo e é absorvida pelo músculo, desencadeando efeitos nessa região mais profunda (DRAPER; SUNDERLAND, 1993). Neste sentido, é possível inferir que o ultrassom, em valores de frequência e potências efetivas para o alcance de músculos esqueléticos e tecidos adiposos, poderia converter a energia potencial armazenada no ácido graxo em adenosina trifosfato (ATP), e assim contribuir para a redução da gordura corporal.

A terapia ultrassônica também pode ser utilizada, associadamente, com outras técnicas de terapia física com a obtenção de resultados satisfatórios em humanos (CHANG et al., 2014; EL-HAMED; EL-GENDY; RAHMAN, 2014; FRIEDMANN, 2015). Entretanto, a associação da terapia ultrassônica com o treinamento físico tem sido pouco estudada, sendo encontrados dois estudos, apontando apenas os efeitos sobre o perfil lipídico e espessura do tecido adiposo, em ratos (DALIA et al., 2011) e humanos treinados fisicamente (MIWA et al., 2002).

A prática de natação de 30 minutos, 5 dias por semana durante três semanas por ratos *Wistar* diabéticos, independente de terem sido tratados com a terapia ultrassônica a 0,2W/cm<sup>2</sup>, reduziu a glicose plasmática e os triglicerídeos no músculo

sóleo quando comparados aos ratos sedentários tratados ou não tratados com ultrassom (DALIA et al., 2011). Já a associação de caminhada durante 10 dias com a terapia ultrassônica de 1MHz, 0,5W/cm<sup>2</sup> por 10 minutos reduziu a espessura do tecido adiposo na região interna da coxa de homens, algo que não ocorreu após a realização de exercício físico isolado (MIWA et al., 2002).

Dessa forma, a carência de estudos sobre os efeitos do uso isolado da terapia ultrassônica não focada de alta potência ou associada com o treinamento físico de *endurance* de intensidade moderada sobre o perfil lipídico, inflamatório sistêmico, do tecido adiposo e hepático, assim como lipolítico no tecido adiposo, homeostase da glicose e insulina apontam a necessidade da investigação sobre os efeitos desses recursos utilizados, isolados ou associados com fins lipolíticos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar as implicações da estimulação ultrassônica de alta potência associada ou não ao treinamento físico de intensidade moderada sobre o perfil metabólico e inflamatório sistêmico e dos tecidos adiposos e hepático em ratos *Wistar* machos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da estimulação ultrassônica de alta potência associada ou não ao treinamento físico de intensidade moderada em ratos *Wistar* machos sobre:

- As medidas corporais e dos tecidos adiposos branco e marrom, glândulas adrenais, fígado e índice de Lee;
- O perfil morfométrico dos tecidos adiposos;
- O perfil bioquímico-metabólico e hormonal sistêmico;
- O metabolismo da glicose e homeostase da insulina;
- O perfil lipolítico e lipogênico dos tecidos adiposos;
- Os níveis plasmáticos de interleucina-6 e proteína C reativa;
- O perfil inflamatório do tecido adiposo e hepático;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 68 ratos *Wistar* provenientes do Centro de Criação de Animais do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA), os quais foram mantidos no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde/UFBA em ambiente com controle de luz (12 horas de luz, das 7 às 19h) e temperatura ( $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e livre acesso à água e ração. As recomendações do Instituto Nacional de Saúde para os cuidados e uso de animais de laboratório foram seguidas e esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Feira de Santana (Parecer 009/2011).

Os animais consumiram a ração padronizada (Purina®, São Paulo, SP) segundo recomendações do Instituto de Nutrição Americana (AIN 93), descrita por Reeves; Nielsen; Fahey (1993). Os ratos de oito semanas de idade foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais por 10 semanas: Treinados fisicamente e não treinados fisicamente. Dessa forma, existiram, inicialmente, dois grupos experimentais, um grupo composto pelos ratos machos treinados e outro, pelos ratos machos não treinados.

Nos 10 últimos dias do período de treinamento físico, cada grupo descrito acima foi subdividido, aleatoriamente, em dois novos subgrupos de acordo com o protocolo de estimulação ultrassônica. Assim, houve quatro grupos experimentais, como disposto a seguir:

- Ratos não treinados e sem ultrassom (NS) (n=10);
- Ratos treinados e sem ultrassom (TS) (n=8);
- Ratos não treinados e com ultrassom (NU) (n=10);
- Ratos treinados e com ultrassom (TU) (n=8);

Nos demais momentos em que não eram realizados o treinamento físico ou estimulação ultrassônica, os animais foram acomodados em caixas de polipropileno

com, no máximo, cinco animais em cada uma delas de acordo com o tipo de treinamento e estimulação ultrassônica recebida ou não.

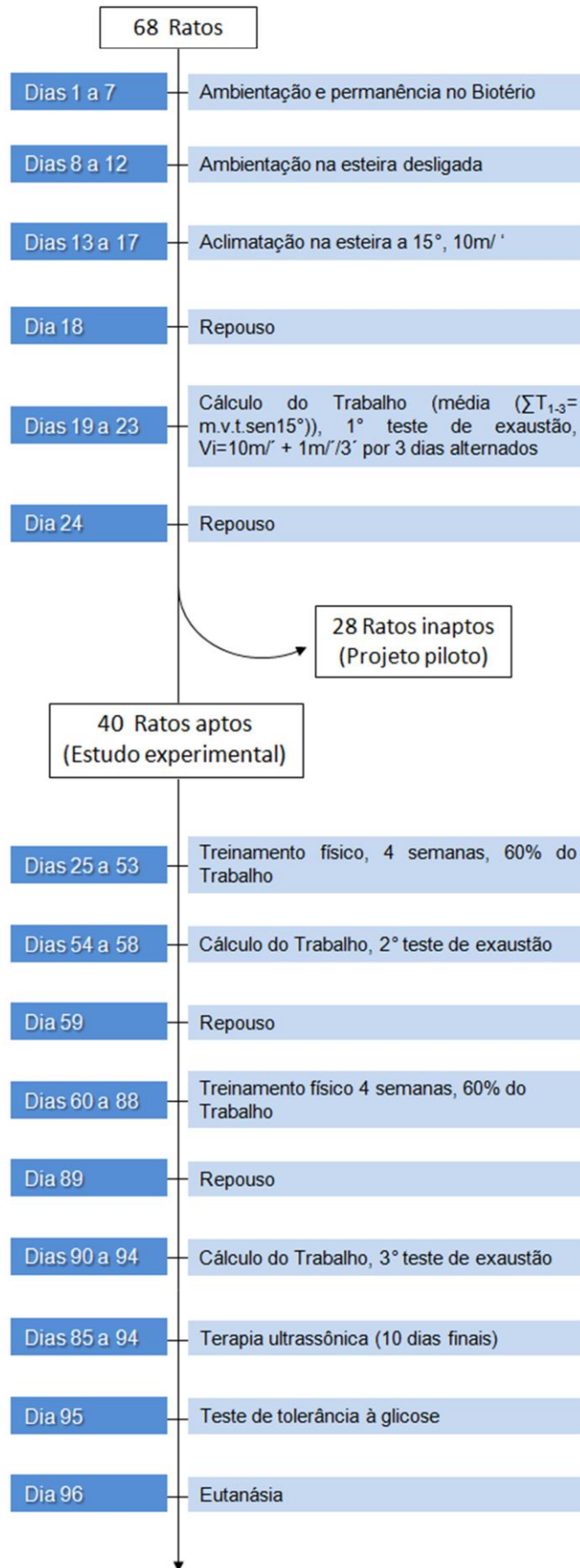
## **4.2 Procedimento experimental**

### **4.2.1 Ambientação à corrida em esteira**

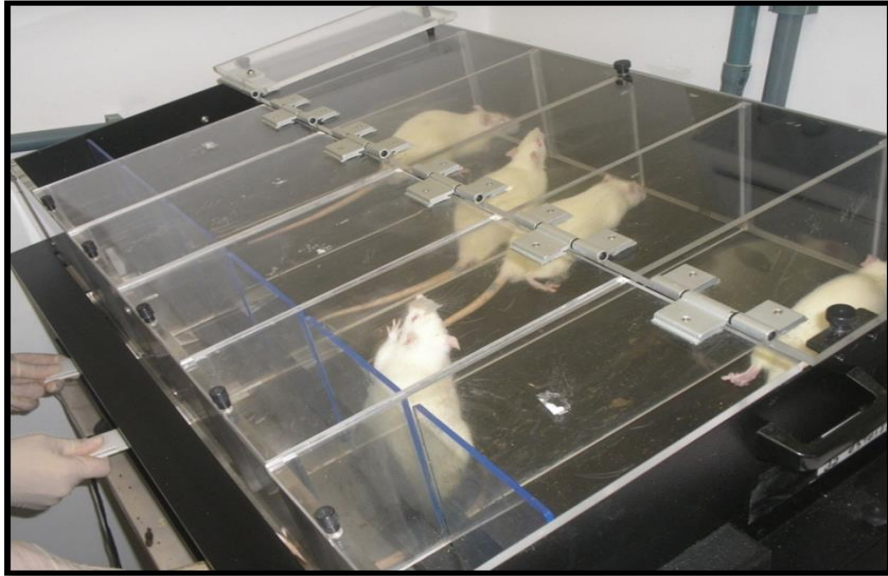
Sessenta e oito animais com oito semanas de idade, após a permanência por 7 dias (Figura 3 - dias 1 a 7 do experimento) no Biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde-UFBA, foram colocados em baias individuais na esteira elétrica motorizada AVS projetos® (Figura 4) durante cinco dias consecutivos (Figura 3 - dias 8 a 12 do experimento). Nesse período, a esteira permaneceu desligada por 5 minutos e inclinada a 15 graus.

### **4.2.2 Aclimação dos animais e seleção dos corredores**

Os animais foram colocados, em baias individuais da esteira motorizada elétrica, para correr durante 5 dias consecutivos (Figura 3 - dias 13 a 17 do experimento) com a esteira ligada e a velocidade aumentada, em um metro/minuto a cada seis segundos, até atingir 10m/min. Nesta velocidade, os animais correram por 5 minutos, em inclinação de 15° (DE QUEIROZ et al., 2014) conforme ilustrado na figura 4.



**Figura 3** - Procedimentos experimentais realizados nos 68 ratos *Wistar*.



**Figura 4** – Foto ilustrativa do período de seleção dos ratos aptos para a atividade física em esteira motorizada elétrica AVS Projetos®. Foram considerados como ratos inaptos, os animais que se mantiveram estáticos na região posterior da esteira por 10 segundos em qualquer um dos três dias do primeiro teste de exaustão, conforme visualizado com o rato da segunda baia da direita para a esquerda.

Após este período de aclimação e seleção, os animais aptos para realizar o esforço, foram distribuídos nos grupos dos animais que praticariam a atividade física ou se tornariam sedentários. Foram considerados como ratos inaptos, os 28 animais que se mantiveram estáticos na região posterior da esteira por 10 segundos em qualquer um dos três dias do primeiro teste de exaustão (DE QUEIROZ et al., 2014). Os ratos inaptos foram excluídos do experimento de treinamento físico e destinados ao estudo piloto de determinação da potência média da aplicação do ultrassom que foi utilizada, posteriormente, nos ratos submetidos ao treino físico em esteira.

Durante o experimento de treinamento físico e/ou terapia ultrassônica, 2 ratos morreram por diferentes motivos, 1 foi excluído por apresentar lesões na pele e outro por se tornar inapto no decorrer do experimento. Assim, o experimento constou com uma amostra final de 10 animais aptos pertencentes ao grupo NS, 10 animais aptos no grupo NU, 8 animais aptos no grupo TS e 8 ratos aptos no grupo TU, além de 7 animais inaptos em cada um dos grupos do projeto piloto para determinação da potência média ultrassônica.



### 4.2.3 Teste de exaustão e avaliação do desempenho físico

Após 2 dias do fim do período de aclimação, os 40 animais aptos foram submetidos à avaliação individual do desempenho físico, primeiro teste de exaustão (Figura 3 - dias 19 a 23 do experimento). Esta avaliação consistiu em três sessões de corrida em dias alternados. Os animais foram expostos, em cada uma das sessões, ao aparato da esteira elétrica desligada por cinco minutos. A seguir, a esteira foi ligada e a velocidade, gradativamente, aumentada até alcançar dez metros por minuto. A partir deste momento, a cada três minutos, a velocidade foi elevada em um metro por minuto até a fadiga do animal (MONJO; PUJOL; ROCA, 2005).

Foi considerado como fatigado, o animal que permaneceu imóvel sobre a esteira elétrica por dez segundos consecutivos ou por três períodos de dois segundos ao longo de um minuto. Nestas situações, o animal foi retirado da esteira, sendo registrados o tempo de corrida e a velocidade alcançada em cada uma das três sessões de avaliação (WANNER et al., 2011).

Para o cálculo do trabalho realizado durante cada dia do teste de exaustão foi utilizada a fórmula:

$$W = m.t.v.\text{sen}15^\circ$$

Em que: W = trabalho em Joule, m= massa corporal no dia da sessão de avaliação, em Kg, t= tempo em minutos, v= velocidade em m/min,  $\text{sen}15^\circ$  = seno de  $15^\circ$  referente à inclinação da esteira (BROOKS; WHITE, 1978), sendo o trabalho realizado no primeiro, segundo e terceiro dia de teste representado, respectivamente, por  $W_1$ ,  $W_2$  e  $W_3$  (BROOKS; WHITE, 1978; DE QUEIROZ et al., 2014).

Esse teste de exaustão e avaliação do desempenho físico foi realizado também após 4 semanas, segundo teste de exaustão (Figura 3 - dias 54 a 58 do experimento) e 8 semanas de treinamento físico em esteira, terceiro teste de exaustão (Figura 3 - dias 90 a 94 do experimento), a fim de verificar mudanças da performance física dos animais (DE QUEIROZ et al., 2012).

#### **4.2.4 Treinamento físico na esteira**

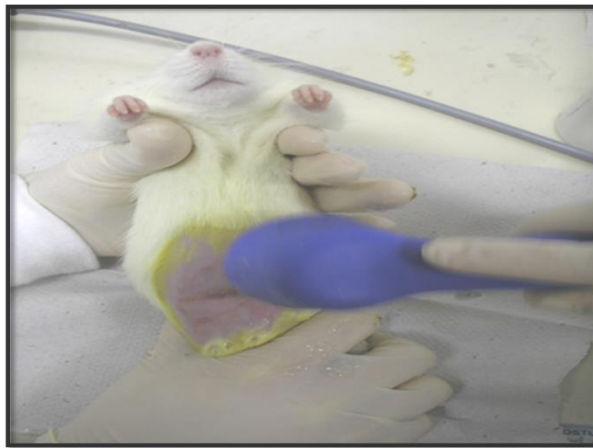
Após 2 dias do teste de exaustão (primeiro e segundo teste de exaustão), foi iniciado o primeiro período de treinamento físico (Figura 3 - dias 25 a 53 do experimento) na esteira motorizada. O protocolo de treinamento para ambos os grupos – treinado e não treinado consistiu na realização de exercício por 8 semanas em dias alternados na esteira, respectivamente, ligada e desligada. O protocolo de treinamento físico de intensidade moderada utilizado foi baseado no tempo necessário para alcançar um valor correspondente a 60% do trabalho no dia de melhor desempenho do animal durante o primeiro teste de exaustão (NUNES-SILVA et al., 2014).

Nesse protocolo, o treinamento físico nos grupos treinados foi realizado com a esteira inclinada em 15 graus e com uma velocidade inicial de 10m/minuto, porém essa velocidade foi aumentada em 1m/minuto a cada 3 minutos, de forma semelhante ao aumento de velocidade descrito no teste de exaustão (Adaptado de KOCH et al., 2005). Após 4 semanas de treinamento físico na esteira elétrica motorizada, foi calculado novamente o valor correspondente a 60% do trabalho no dia de melhor desempenho do animal durante o segundo teste de exaustão, para que esse fosse usado como tempo alvo de treino das 4 semanas seguintes (Figura 3 - dias 60 a 88 do experimento) (DE QUEIROZ et al., 2012).

O treinamento físico ocorreu durante o período da manhã e os animais que apresentaram lesões na pele ou que se tornaram inaptos no decorrer do experimento foram excluídos dos grupos experimentais.

#### 4.2.5 Estudo piloto para a determinação da potência média a ser utilizada na terapia ultrassônica

Após a seleção dos ratos aptos, 1 dia após o último dia do primeiro teste de exaustão, os 28 ratos machos inaptos, sete animais por grupo experimental, foram tricotomizados digitalmente na área (aproximadamente 10cm<sup>2</sup>) a ser tratada com a terapia ultrassônica, considerando-se certa homogeneidade do depósito de gordura corporal humana. Foi estabelecida a área da região abdominal, lateralmente, entre a última costela e a crista ilíaca superior e, ventralmente, entre o processo xifóide do esterno e a região inguinal para o tratamento com a terapia ultrassônica, conforme visualização da região tricotomizada no animal da Figura 5.



**Figura 5** – Foto ilustrativa da aplicação da terapia ultrassônica.

A aplicação do ultrassom foi realizada mediante ao acoplamento do cabeçote ultrassônico no couro do animal com gel a base de água para facilitar a passagem das ondas, conforme Figura 5. O gel foi aquecido a 40°C previamente a aplicação para que ficasse próximo à temperatura corporal e, conseqüentemente, mais agradável para o rato.

Um dia após a tricotomia, foi iniciado o protocolo de terapia ultrassônica, sendo que durante a aplicação, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, com as patas dianteiras e traseiras, contidas manualmente, para evitar movimentos, e

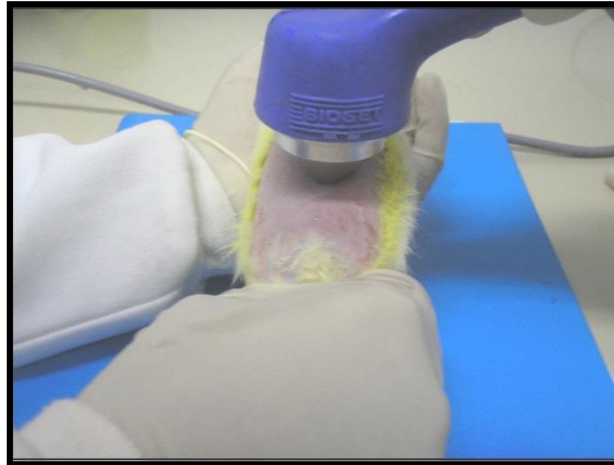
conseqüentemente, minimizar a reflexão do ultrassom, enquanto outra pessoa realizava a aplicação ultrassônica.

Os 28 ratos classificados como inaptos foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos no Experimento piloto, submetidos à terapia ultrassônica de  $1\text{W}/\text{cm}^2$  (Grupo US1),  $2\text{W}/\text{cm}^2$  (Grupo US2) e  $3\text{W}/\text{cm}^2$  (Grupo US3) e a terapia ultrassônica controle (Grupo UC) com o ultrassom desligado.

Os demais parâmetros da estimulação ultrassônica foram invariáveis entre os grupos, a saber: frequência moduladora de 100Hz; pulsado a 50%; regime de pulso de 5ms on: 5 ms off; frequência portadora de 3MHz; tempo estimado em 20 minutos, correspondente a área da aplicação dividida pela área de radiação efetiva (ERA) do cabeçote (Haar, 2009). As áreas de aplicação foram delimitadas por um tempo máximo de 10 minutos por área de aplicação, a fim de evitar dispersão da energia ultrassônica. No grupo controle, o ultrassom foi aplicado desligado durante igual período de tempo.

Nesse estudo piloto foram realizadas 10 aplicações ultrassônicas em dias consecutivos. O cabeçote de aplicação foi mantido em posição perpendicular a pele do animal e movido bilateral e sistematicamente de baixo para cima durante toda a aplicação, para evitar a formação de ondas estacionárias. Para tanto, foi utilizado equipamento gerador de ultrassom disponível comercialmente – Sonacel Expert 3MHZ (Bioset®) com o cabeçote adaptado a  $0,5\text{cm}^2$  (Figura 6) e com produção de ciclos contínuos e pulsados. Antes do início do experimento, o transdutor ultrassônico foi calibrado em balança de precisão numa empresa de assistência técnica da fabricante. Antes de cada aplicação do ultrassom em todo o estudo piloto foi realizado um teste diário de emissão ultrassônica (teste da névoa) em que foi colocada água sobre o cabeçote de aplicação para observar a formação de bolhas.

A potência média ultrassônica de  $3\text{W}/\text{cm}^2$  foi a mais eficiente para a lipólise no estudo piloto, por análise indireta baseada na redução da massa corporal e dos depósitos de tecido adiposo, principalmente o TASC e, portanto, foi a utilizada para a aplicação da terapia ultrassônica nos ratos aptos.



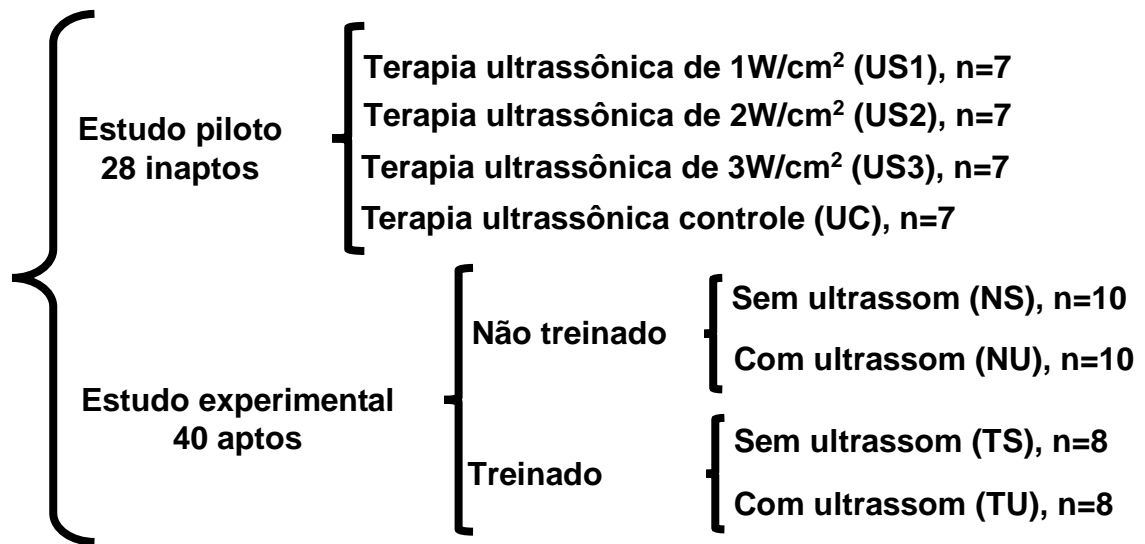
**Figura 6** – Foto ilustrativa do cabeçote do aparelho de ultrassom Sonacel Expert 3MHz reduzido a 0,5cm<sup>2</sup>.

#### **4.2.6 Estudo experimental de estimulação ultrassônica**

Nos últimos dez dias de realização do treinamento físico em esteira, foi iniciada a terapia por estimulação ultrassônica (Figura 3 - dias 85 a 94 do experimento). Nessa etapa, os animais aptos que realizaram o treinamento físico em esteira elétrica motorizada foram divididos em dois subgrupos experimentais: animais sob estimulação ultrassônica (grupo TU) e sem estimulação ultrassônica – aplicação com o aparelho desligado (grupo TS), enquanto que os ratos que permaneceram sedentários durante o experimento foram subdivididos em dois grupos experimentais: ratos sob estimulação ultrassônica (grupo NU) e sem estimulação ultrassônica (grupo NS).

Para tanto, foram utilizados os mesmos parâmetros, tempo de aplicação, número de sessões, procedimentos de acoplamento e técnica de tricotomia, descritos anteriormente para o estudo piloto de determinação da potência média na terapia ultrassônica e utilizando a potência média de 3W/cm<sup>2</sup> que foi a determinada no estudo piloto como a potência mais eficiente para a redução da massa corporal e dos depósitos de tecido adiposo.

A figura 7 apresenta a distribuição dos animais de acordo com os procedimentos experimentais do estudo.



**Figura 7** - Distribuição dos animais conforme os procedimentos experimentais. A potência média do ultrassom empregada nos grupos NU e TU foi de 3W/cm<sup>2</sup>.

### 4.3 Mensuração da pressão arterial sistólica

As medidas da pressão arterial sistólica foram realizadas pelo método de pletismografia de cauda utilizando-se o medidor Panlab®, conforme Figura 8. Essas mensurações ocorreram apenas no projeto piloto de determinação da potência média ultrassônica.



**Figura 8** – Foto ilustrativa da mensuração da pressão arterial por pletismografia de cauda.

#### 4.4 Composição corporal e índice de obesidade

A massa corporal e o comprimento nasoanal (NA) dos ratos foram mensurados no início e fim do treinamento físico em esteira, respectivamente, por meio de uma balança digital semi-analítica BL-3200H da marca Shimadzu® e fita métrica. Para a mensuração do NA, os ratos foram contidos manualmente. Em seguida, foi calculado o índice de obesidade para roedores (*Lee Index*) por meio da equação (BERNARDIS; PATTERSON, 1968):

$$Lee = \frac{\sqrt[3]{M}}{NA}$$

Em que:  $\sqrt[3]{M}$  = raiz cúbica ( $\sqrt[3]{}$ ) da massa corporal (gramas), NA = comprimento nasoanal (centímetros).

#### 4.5 Teste de tolerância à glicose

Para estimativa da captação sistêmica da glicose, o teste de tolerância à glicose foi realizado vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento físico e terapia ultrassônica (Figura 3 – dia 95 do experimento). Os animais permaneceram 12 horas em privação alimentar, após os quais receberam uma administração de sobrecarga de solução de glicose a 5% (1g/Kg de peso corporal) por via intraperitoneal. A glicemia foi dosada em uma gota de sangue coletada da cauda, em glicosímetro Accu-chek active da marca Roche®. As mensurações da glicose plasmática ocorreram imediatamente antes da administração de sobrecarga de solução de glicose e 15, 30, 60 e 90 minutos após, possibilitando o traçado da curva glicêmica (ISHIDA et al., 1996). Para a interpretação desse parâmetro, foi feito o

cálculo da área sob a curva pelo método trapezoidal conforme demonstrado por Matthews et al. (1990).

#### **4.6 Eutanásia dos animais**

Dois dias após o fim do experimento de treinamento físico e/ou terapia por estimulação ultrassônica (Figura 3 - dia 96 do experimento), os ratos, em privação alimentar de 12 horas, foram eutanasiados por decapitação sem anestesia prévia. O TAME, TAR, TAE, TASC e TAMAR, assim como o fígado e as glândulas adrenais foram removidos e as massas mensuradas. A massa do TAV foi estimada como o somatório das massas do TAME, TAR e TAE e a massa do TAB como o somatório das massas do TAME, TAR, TAE e TASC. A eutanásia dos animais de cada grupo experimental ocorreu em um único dia, sendo seguida a ordem de aplicação da última sessão de terapia ultrassônica nos animais.

A lipectomia bilateral foi realizada mediante incisão longitudinal de  $\pm 6$ cm na pele abdominal, tendo como referência a linha alba. Em sequência, os depósitos adiposos, glândulas adrenais e fígado foram extraídos.

Alíquotas do fígado e dos tecidos adiposos brancos foram acondicionados em tubos plásticos contendo trizol e imediatamente, armazenados em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ , para posteriores análises de expressão gênica. Outra alíquota dos tecidos adiposos e fígado foi fixada imediatamente em solução de metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) para avaliação histológica e de imunohistoquímica. Uma terceira alíquota de TAB foi utilizada para a realização do procedimento de gravitometria.

O sangue do tronco foi coletado em tubos resfriados e heparinizados contendo inibidores de proteases (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA a  $10^{-5}$  mol/L, adquiridos na Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) ou em tubo seco para obtenção de soro. Após a centrifugação (3000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos), o plasma e o soro foram separados e armazenados em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização de dosagens de HDL-c, LDL-c, triglicerídeos, glicose, ácidos graxos livres, insulina, estrógeno, testosterona, cortisol, leptina e IL-6.



Nos ratos do teste piloto somente foi coletado o sangue do tronco para a dosagem de HDL-c, LDL-c, triglicerídeos, proteína C reativa, glicose, insulina e ácidos graxos livres e os tecidos adiposos para análises morfométricas com hematoxilina e eosina.

#### **4.7 Perfil bioquímico-metabólico e hormonal**

##### **4.7.1 Dosagem dos ácidos graxos**

A dosagem dos ácidos graxos livres no plasma foi realizada por meio de Kit comercial enzimático colorimétrico NEFA-HR (2) da Randox®. A reação de quimioluminescência resultante foi medida como unidades de luz relativas (RLU) que foram detectadas pelo analisador de imunoensaio Architect i1000SR da Abbott Diagnostics®. Os resultados foram expressos em mmol/L.

##### **4.7.2 Dosagem da glicose**

Para a dosagem da glicose, o soro obtido durante a eutanásia dos animais foi analisado por meio de Kit comercial enzimático colorimétrico Bioclin®. A leitura da absorbância foi realizada em 505nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

##### **4.7.3 Dosagem do HDL-c**

Para a dosagem do HDL-c, o soro obtido durante a eutanásia dos animais foi analisado por meio de Kit comercial enzimático colorimétrico Bioclin®. A leitura da absorbância foi realizada a 550nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

#### **4.7.4 Dosagem do LDL-c**

Para a dosagem do LDL-c, o plasma obtido na eutanásia dos animais foi analisado por meio de Kit comercial enzimático colorimétrico Bioclin®. A absorvância foi medida em 600nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

#### **4.7.5 Dosagem dos triglicerídeos**

Para a dosagem dos triglicerídeos, o plasma obtido na eutanásia dos animais foi analisado por meio de Kit comercial enzimático colorimétrico Bioclin®. A leitura da absorvância foi realizada a 500 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

#### **4.7.7 Dosagem da insulina e leptina**

As dosagens de insulina e leptina plasmática foram realizadas no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, por meio da técnica de radioimunoensaio utilizando o método de duplo anticorpo, respectivamente, por meio de Kits comerciais SRI-13K e RL-83K da Millipore®, St. Charles, Missouri – USA. As concentrações de insulina e leptina foram dadas em ng/mL por meio da construção de curva de calibração com os reagentes calibradores próprios de cada kit, sendo que os precipitados formados na reação foram decantados e a radioatividade dos imunocomplexos presentes nos pellets determinada por contador gama (LKB) (MA et al., 1996).

#### **4.7.8 Determinação do HOMA-IR e capacidade funcional das células $\beta$ pancreáticas**

Após a terapia ultrassônica, a resistência à insulina foi estimada por meio do cálculo do modelo de avaliação homeostática de resistência insulínica (HOMA-IR), a partir da concentração da insulina plasmática de jejum ( $\mu\text{UI/mL}$ ) e da concentração da glicose de jejum ( $\text{mmol/L}$ ) dos animais (MATTHEWS et al., 1985), conforme a fórmula descrita a seguir:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{[I \times G]}{22,5}$$

Onde, I é a concentração plasmática de insulina basal (jejum) ( $\mu\text{UI/mL}$ ) e G, a concentração plasmática de glicose basal (jejum) ( $\text{mmol/L}$ ). Para a conversão da glicose de  $\text{mg/dL}$  para  $\text{mmol/L}$ , multiplicou-se o valor em  $\text{mg/dL}$  por 0,0555.

A determinação da capacidade funcional das células beta foi determinada pela fórmula (MATTHEWS et al., 1985):

$$\text{HOMA-}\beta = \frac{[20 \times I]}{G} - 3,5$$

Onde: HOMA- $\beta$ = Índice de capacidade funcional das células beta, I= insulinemia de jejum [ $\text{mmol/L}$ ] e G= glicemia de jejum [ $\text{mmol/L}$ ].

Para a avaliação da resistência insulínica, foi calculado o *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* (QUICKI), determinado por (KATZ et al., 2000):

$$\text{QUICKI} = \text{LogI} + \text{LogG}$$

Em que:  $\text{LogI}$ = Log insulina [ $\mu\text{UI/mL}$ ] e  $\text{LogG}$ = Log glicemia [ $\text{mg/dL}$ ].

Para o cálculo do QUICKI revisado (QUICKI-R), utilizou-se a seguinte fórmula (PERSEGHIN et al., 2001):

$$\text{QUICKI-R} = \frac{1}{\text{LogI} + \text{LogG} + \text{LogAGL}}$$

Onde: LogI= log [insulina (uUI/mL)], LogG= log[glicose (mg/dL)], LogAGL= log[AGL (mmol/L)].

#### **4.7.9 Dosagem de estradiol, testosterona e cortisol**

Para a dosagem do estradiol, testosterona e cortisol no soro foi utilizado o método de quimioluminescência (imunoensaio), respectivamente, com os kits de dosagem Architect (Ref: 7K72), (Ref: 2P13) e (Ref: 8D15). As reações de quimioluminescência resultantes foram medidas como unidades de luz relativas (RLU) e detectadas pelo analisador de imunoensaio Architect i1000SR da Abbott Diagnostics® no Laboratório Central de Vitória da Conquista-BA. Os resultados das dosagens de estradiol, testosterona e cortisol foram expressos, respectivamente, em pg/mL, ng/dL e µg/dL.

### **4.8 Perfil inflamatório sistêmico**

#### **4.8.1 Dosagem de IL-6**

Para a dosagem de IL-6 plasmático foi utilizado o kit comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Abcam®) (Ref: KRC0061) tipo sanduíche em fase sólida específico para estas citocinas de ratos e o procedimento foi realizado conforme as

orientações do fabricante. A técnica consistiu na utilização de uma placa de 96 poços sensibilizados com os anticorpos monoclonais anti-IL-6, específicos para ratos, sendo a leitura da reação de ELISA realizada em equipamento próprio a 450nm e os resultados expressos em pg/mL.

#### **4.8.2 Dosagem de Proteína C reativa**

Para dosagem da proteína C reativa no soro foi utilizado o kit PCR ultrasensível da Wiener Lab®, caracterizado por uma reação imunoturbidimétrica baseada na turbidez resultante da reação entre a proteína C reativa com partículas de látex aderidas a anticorpos para a proteína C reativa, sendo a concentração proporcional a turbidez gerada. A quantificação foi feita pelo método de quimioluminescência no aparelho CM 250 da Wiener Lab®.

### **4.9 Reação em cadeia polimerase (PCR)**

#### **4.9.1 Extração de RNAm**

O RNA do tecido adiposo dos depósitos subcutâneo abdominal, mesentérico, retroperitoneal, epididimal e fígado dos animais foi isolado de acordo com o método de tiocionato-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). Após a eutanásia dos animais, os tecidos foram rapidamente removidos, armazenados em tubos plásticos estéreis contendo solução de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol®), 1mL/100mg de tecido e armazenados a -70°C.

No dia da extração, aproximadamente 100mg das amostras dos tecidos foram trituradas por um homogeneizador elétrico e o precipitado de RNA resultante foi ressuspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Em seguida, a concentração e a pureza do RNA foram determinadas pela leitura da densidade

óptica com o auxílio do Nanodrop®. As leituras foram realizadas em 260nm e a pureza averiguada com o cálculo das razões 260/280nm, 260/230nm.

Após a extração, 1µg de RNA dos tecidos foi submetido à transcrição reversa para posterior realização da PCR como será descrito posteriormente.

#### **4.9.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) - Transcrição reversa**

A obtenção do cDNA foi feita através de uma retro-transcrição (RT) a partir do RNAm, utilizando-se oligonucleotídeos complementares a cauda poli-A do RNAm, oligo-dT(15) *primer*, água tratada com DEPC. Em seguida, os tubos foram aquecidos em termociclador por 5 minutos a 70°C para desnaturação do RNA e oligo-dT *primer* e depois, a reação foi interrompida por incubação em gelo. Logo após, foram adicionados aos tubos, tampão Impro III 5x buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP (0,5mM), RNase out recombinante, enzima transcriptase reversa Impro III, água tratada com DEPC. A solução foi então mantida a 40°C por 60 minutos para a síntese de c-DNA.

Após agitar o volume resultante, os ependorfs foram colocados no termociclador a 25°C por 5 minutos, 42 graus por 1 hora, seguido por congelamento para inativar a transcriptase reversa.

#### **4.9.3 Amplificação do cDNA**

Após a síntese do cDNA foi realizada a PCR para amplificação do c-DNA para HSL, lipoproteína lipase (LPL), ATGL, IL-6, TNF- $\alpha$ , PKA, receptor  $\beta_3$ -adrenérgico,  $\beta$ -actina, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) com pares de *primers* baseados em sequencias previamente publicadas. A  $\beta$ -actina foi amplificada como controle interno de cada PCR do fígado, enquanto o gene GAPDH foi amplificado como controle interno de cada PCR dos tecidos adiposos. Todos os *primers* foram testados em relação a sua amplificação em regiões codificadoras (CDS) ou regiões

não tradutoras (3'-UTR ou 5'-UTR). As sequências de *primers* e condições de amplificação de cada gene são descritas na Tabela 1.

A PCR foi realizada adicionando 24µl de solução MIX PCR a 1µl da solução contendo cDNA. Esse tampão foi formado por buffer 1X, MgCl<sub>2</sub>, Mix DNTP, *primer forward*, *primer reverse*, Taq polimerase, água DEPC (AL-BADER, 2006). Como controle negativo foi utilizada água no lugar do cDNA no processo de PCR. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi revelado com brometo de etídio (0,6µg/ml), visualizado em luz ultravioleta e posteriormente digitalizado. As bandas foram quantificadas através do programa Image J e os resultados foram representados por três PCR para cada amostra.

**Tabela 1** - Sequências de *primers* e condições de amplificação dos genes utilizados na biologia molecular

<b>Nome do gene</b>	<b>Sequência (5´-3´) senso e antisenso</b>	<b>Condições de amplificação</b>
HSL (610bp)	TGCATCACGGTGTCCCTTCGG TCAGCCTCTTCCTGGGAATTC	e 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 6 minutos durante 36 ciclos (KRISTENSEN et al., 1998).
LPL (276bp)	GAGATTTCTCTGTATGGCACA CTGCAGATGAGAACTTTCTC	e 95°C por 3 minutos seguidos por 32 ciclos a 95 graus por 18 segundos, 62 graus por 20 segundos, 72 graus por 40 segundos e 72 graus por 7 minutos (HUEY et al., 1998).
ATGL (148bp)	TAGCATCTGCCAGTATCTGGTGAT AGGCCACATTGGTGCAGAAGAGA	e 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 65°C por 15 segundos, e 72°C por 1 minuto (MELLO et al., 2008).
IL-6 (302bp)	CTGGTCTTCTGGAGTTCCGTTTC CATAGCACACTAGGTTTGCCGAG	e 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e logo depois, 72°C por 10 minutos (PARK; LIM; KIM, 2009).
TNF- $\alpha$ (250bp)	TTGCTTCTTCCCTGTTCC CTGGGCAGCGTTTATTCT	e 94°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos por 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72 °C por 45 segundos e uma extensão final de 72°C por 1 minuto (LIU et al., 2009).
$\beta_3$ -adrenérgico (308bp)	ATGGCTCCGTGGCCTCAC e CCCAACGGCCAGTGGCCAGTCAGCG	5 minutos a 94°C e 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Logo após, uma extensão final a 72°C por 5 minutos (HADRI et al., 1997).
PKA (369bp)	CCAAGAGAGTCAAGGGCAGGAC CAACCTTTCTCGGTAAATCGC	e 2 minutos a 94°C, seguidas por 32 ciclos de 30 segundos cada a 94°C, 55°C e 72°C (FERREIRA et al., 2004).
B-actina (236bp)	GAGACCTTCAACACCCC	e 94°C por 5 minutos, seguido por 25 ciclos de 94°C por 30



	GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC		segundos, 60°C por 1 minuto, mais 72°C por 1 minuto e em seguida 72°C por 5 minutos (LIU et al., 2009)
GAPDH (452bp)	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCCTGTTGTA	e	94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto; 62°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e em seguida 72°C por 1 minuto (BATRA et al., 2007)

HSL= Lipase hormônio sensível, LPL= Lipoproteína lipase, ATGL= Lipase de triglicerídeos, IL-6= Interleucina-6, TNF- $\alpha$ = Fator de necrose tumoral alfa, PKA= Proteína quinase do tipo A, GAPDH= Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.

#### **4.10 Avaliação histológica do tecido adiposo e do parênquima hepático**

As amostras de tecido hepático e dos depósitos de tecido adiposo foram retiradas após a eutanásia dos animais e imediatamente fixadas em solução *Metacar*” preparada com concentração de 60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial. Os tecidos permaneceram nesta solução de fixação por 24 horas, e a seguir foram mantidos em solução de álcool 70%.

##### **4.10.1 Avaliação histológica do tecido hepático**

Em cada lâmina de tecido hepático, um dos cortes foi selecionado para a avaliação histológica, que consistiu na leitura de 20 campos microscópios em aumento de 100X (DIXON et al., 2004). Em cada um dos 20 campos analisados foram contados o número total de hepatócitos, o número de hepatócitos com microvesículas e o número de hepatócitos com macrovesículas.

A determinação do grau de esteatose foi baseada no escore de Brunt (KLEINER et al., 2005): grau 0: quando <5% dos hepatócitos apresentam macrovesículas; grau 1: quando 5-33% dos hepatócitos apresentam macrovesículas; grau 2: quando 33-66% dos hepatócitos apresentam macrovesículas; grau 3: quando >66% dos hepatócitos apresentam macrovesículas.

##### **4.10.4 Avaliação histológica dos tecidos adiposos**

Os adipócitos dos tecidos adiposos corados com hematoxilina e eosina foram analisados morfometricamente através de fotomicrografias em aumento de 20x obtidas em microscópio de luz, equipado com uma câmera digital. Em seguida, a área seccional, o comprimento e a largura foram obtidos através da média aleatória das medidas de 50 adipócitos por lâmina por meio do programa ImageJ®

(TAHERGORABI, RASHIDI; KHAZAEI, 2013). Posteriormente, calculou-se o índice de elipticidade dos adipócitos, por meio da razão entre o comprimento e a largura dos adipócitos (COSTA et al., 2011) e os dados da área de cada célula foram utilizados para o cálculo do volume dos adipócitos (BOURGEOIS et al., 1983).

No tecido adiposo marrom, a área ocupada por inclusões citoplasmáticas lipídicas e de tecido adiposo marrom propriamente dito foi estimada mediante a análise de 5 campos microscópicos em aumento de 20x (BANI; CALOSI; FAGGIOLI, 2014). Para tanto, o programa ImageJ® foi utilizado e as fotomicrografias foram convertidas em escala de cinza e logo após, submetidas à uma etapa de limiarização automática para que incluísse apenas os vacúolos lipídicos. Após as etapas anteriormente descritas, foram mensurados a área ocupada pelo tecido adiposo marrom no campo microscópico em análise e o percentual da fase marcada pelas inclusões lipídicas.

#### **4.10.5 Gravitometria do tecido adiposo**

Para a determinação do conteúdo de gordura nos tecidos adiposos brancos, aproximadamente 1g de cada tecido foi colocado em banho maria e após reação de saponificação com KOH e hidrólise total dos triglicerídeos com o etanol, os ácidos graxos livres da fração lipídica resultante foram extraídos e acidificados. O sobrenadante foi então, acrescido de água destilada, separados com bomba a vácuo, e a mistura de gordura e éter foi transferida para um recipiente previamente pesado, e levado à capela de exaustão até ficar bem seco, quando se procedeu à pesagem diária até seu valor tornar-se constante (STANSBIE et al., 1976).

O total de gordura foi, então mensurado, calculado e os resultados expressos em mg/100mg de cada tecido adiposo (STANSBIE et al., 1976). Em seguida, a massa de cada adipócito foi estimada pela razão entre o volume do adipócito e a massa estimada de gordura de um adipócito obtida na gravitometria, sendo esses valores corrigidos pela densidade da trioleína, de acordo com a fórmula abaixo, em que MG representa a massa estimada de gordura de um adipócito:

$$\text{Massa} = \left( \frac{\text{Volume}}{\text{MG}} \right) / 0,915$$

Posteriormente, o número de adipócitos foi estimado pela razão entre a massa total de cada depósito de tecido adiposo coletado após a eutanásia pela média da massa estimada do adipócito do referido tecido (TCHOUKALOVA et al., 2010; DING; SACKMANN-SALA; KOPCHICK, 2013).

#### 4.10.6 Avaliação Imuno-histoquímica dos tecidos adiposos e hepático

Além dos estudos histológicos, os quatro tipos de tecido adiposo branco abdominal (TAB) coletados foram submetidos à análise imunoistoquímica. Para tanto, as secções de 4 µm de tecido adiposo foram desparafinizadas e incubadas com anticorpos anti-ED-1 (AbD Serotec®), diluído 1/1000 por 60 minutos em temperatura ambiente (DIJKSTRA et al., 1985), anticorpo secundário monoclonal biotilado (IgG antimouse – Bethyl Laboratories®) diluído 1/200 por 30 minutos em temperatura ambiente. O produto da reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories®) e a cor desenvolvida com 3,3-diaminobenzidina (Easypath®). A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris por 5 minutos.

Foram analisados de 15 a 20 campos microscópicos dos cortes com aumento de 40X para a contagem das células marcadas em castanho (macrófagos) e das estruturas *crown-like* definidas por Cinti et al. (2005).

Na avaliação imuno-histoquímica do tecido hepático foram realizados os mesmos procedimentos feitos com os cortes de tecido adiposo, porém a contracoloração dos cortes foi efetuada mediante banho de hematoxilina de Harris por 3 minutos. Foram analisados 25 campos microscópicos dos cortes com aumento de 40X para a contagem das células marcadas (macrófagos) (GADD et al., 2013).

Em seguida, foi calculada a média do número de células marcadas/adipócito/campo microscópico de cada corte para comparação do número de macrófagos entre os grupos experimentais.

#### **4.11. Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados do projeto piloto e dos animais submetidos ao treinamento físico em esteira e/ou terapia ultrassônica foram submetidos ao teste de normalidade das variáveis de Kolmogorov-Smirnov e ao teste de homogeneidade de variância de Bartlett.

##### **4.11.2 Projeto piloto para a determinação da potência média da terapia ultrassônica**

Os dados que apresentaram uma distribuição de normalidade das variáveis e homogeneidade das variâncias foram analisados pela Anova de um fator (Anova one Way) seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. Os dados que não se enquadravam nesses critérios foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis (K-W) e quando necessário, as comparações do post-hoc foram realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM) e o nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

##### **4.11.2 Estudo experimental**

Os dados que apresentaram uma distribuição de normalidade das variáveis e homogeneidade das variâncias foram analisados pela Anova two Way seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados que não se enquadravam nesses critérios foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis (K-W), e quando necessário, foram

submetidos ao teste de comparações múltiplas de Dunn's. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM) e o nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

Análises de correlação de Pearson foram realizadas entre os resultados da massa corporal e massa dos tecidos adiposos com a morfometria, perfil bioquímico-metabólico e hormonal, inflamatório e lipolítico. Como critério para significância, foi considerado o  $p < 0,05$ . Para todas as análises, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prisma® 5.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Projeto piloto para determinação da potência média

#### 5.1.1 Massa corporal e índice de Lee

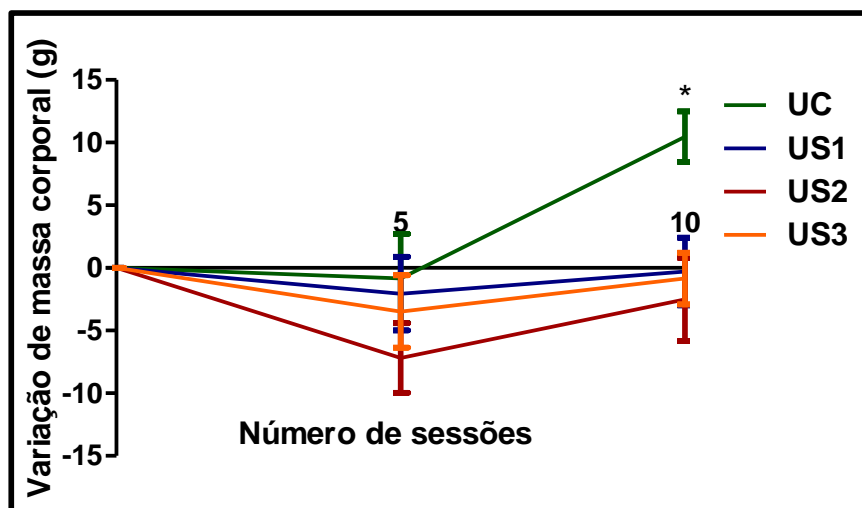
A massa corporal entre os grupos experimentais após 5 e 10 dias de terapia ultrassônica não foi alterada, mas a variação da massa corporal após 10 sessões em todos os grupos experimentais (US1, US2 e US3) mudou quando comparados ao grupo controle. Entretanto, o Índice de Lee não sofreu alteração após as dez sessões de terapia ultrassônica em nenhum grupo experimental conforme a tabela 2.

**Tabela 2** - Massa corporal e índice de Lee dos grupos experimentais UC, US1, US2 e US3

	Grupos experimentais				p valor
	UC	US1	US2	US3	
Massa corporal inicial (g)	318±8	319±14	316±7	318±8	0,9635
Massa corporal- 5 dias (g)	317±7	318±12	309±8	313±13	0,4977
Massa corporal final (g)	325±9	324±16	313±8	315±12	0,8624
Δ de massa corporal (g)	10,5±2,0	-2,4±2,9*	-2,5±3,3*	-0,8±2,1*	0,0065
Índice de Lee final ( $\times 10^{-3}$ )	302±5,0	300±6,0	294±2,0	293±3,0	0,4228

UC= Terapia ultrassônica controle, US1= Terapia ultrassônica de 1W/cm<sup>2</sup>, US2= Terapia ultrassônica de 2W/cm<sup>2</sup>, US3= Terapia ultrassônica de 3W/cm<sup>2</sup>. Dados expressos como média ± EPM. Análises paramétricas por Anova one-way, pós teste de Newman Keuls e não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns: p<0,05; \*US3, US2, US1 vs UC.

Apesar do número de sessões de terapia ultrassônica influenciar a variação de massa corporal ( $p=0,0178$ ), apenas a variável potência ultrassônica ( $p=0,0193$ ) foi capaz de impedir o ganho de massa corporal entre os animais dos grupos US1, US2 e US3 em relação ao grupo UC (Figura 9).

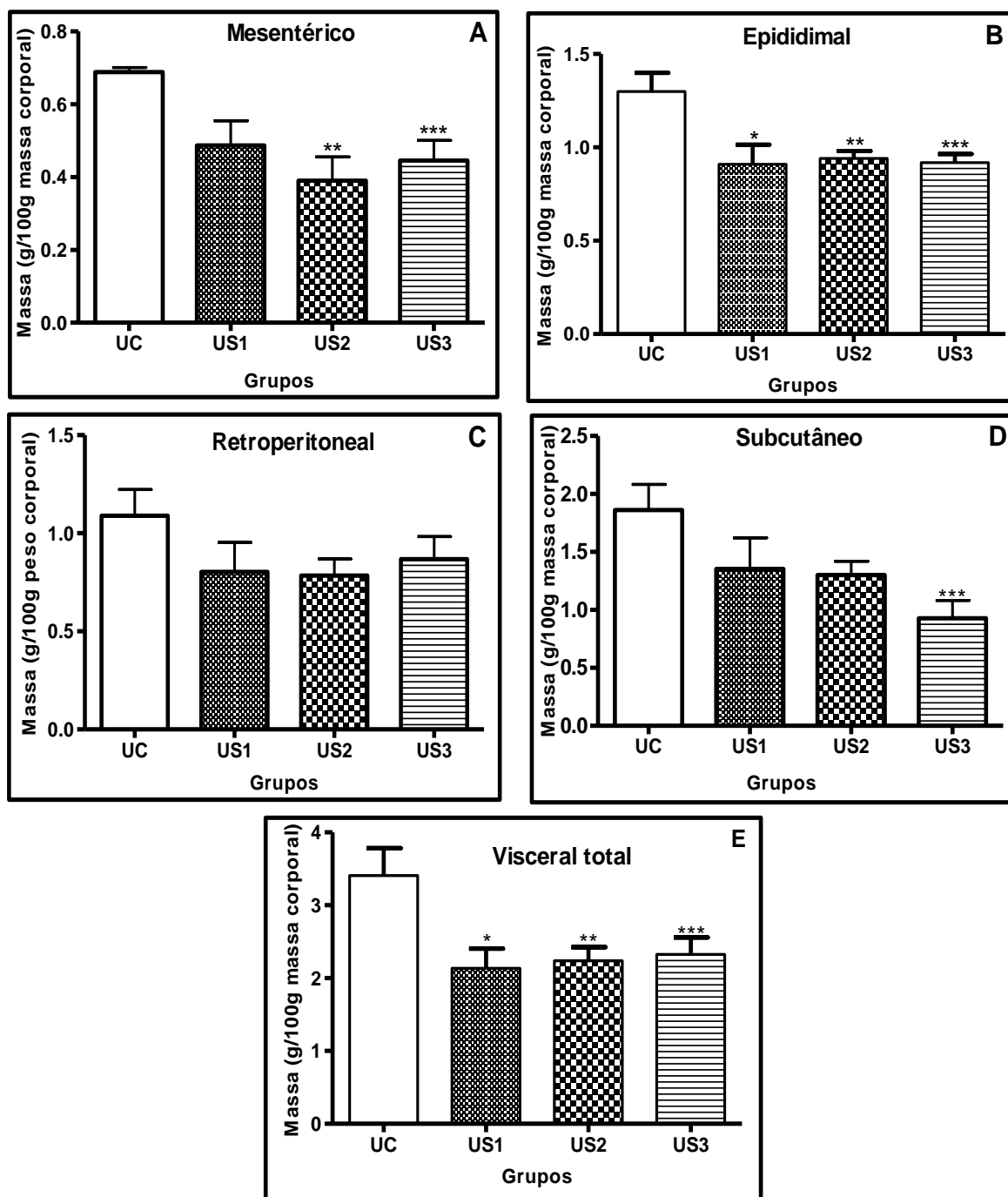


**Figura 9** - Variação da massa corporal em relação ao número de sessões dos grupos experimentais UC, US1, US2 e US3. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. \*US3, US2 e US1 vs UC após 10 sessões, Anova two way, teste de Bonferroni ( $p<0,05$ ). A interação entre a potência e o número de sessões de terapia ultrassônica não foi significativa ( $p= 0,1549$ ) e respondeu por aproximadamente 9,53% do total da variância.

### 5.1.2 Massa de TAME, TAE, TAR e TASC

De forma semelhante, a redução da variação de massa corporal nos grupos experimentais US1, US2 e US3, houve a redução da massa do TAV (Figura 10.E) e epididimal (Figura 10.B) nesses três grupos, porém apenas nos grupos US2 e US3 houve a redução da massa do tecido adiposo mesentérico (Figura 10.A), enquanto que nenhuma potência utilizada nos grupos experimentais foi suficiente para alterar a massa do tecido adiposo retroperitoneal (Figura 10.C). Entretanto, apenas a estimulação com potência de  $3W/cm^2$  resultou em diminuição da massa do TASC em relação ao grupo controle (Figura 10.D).

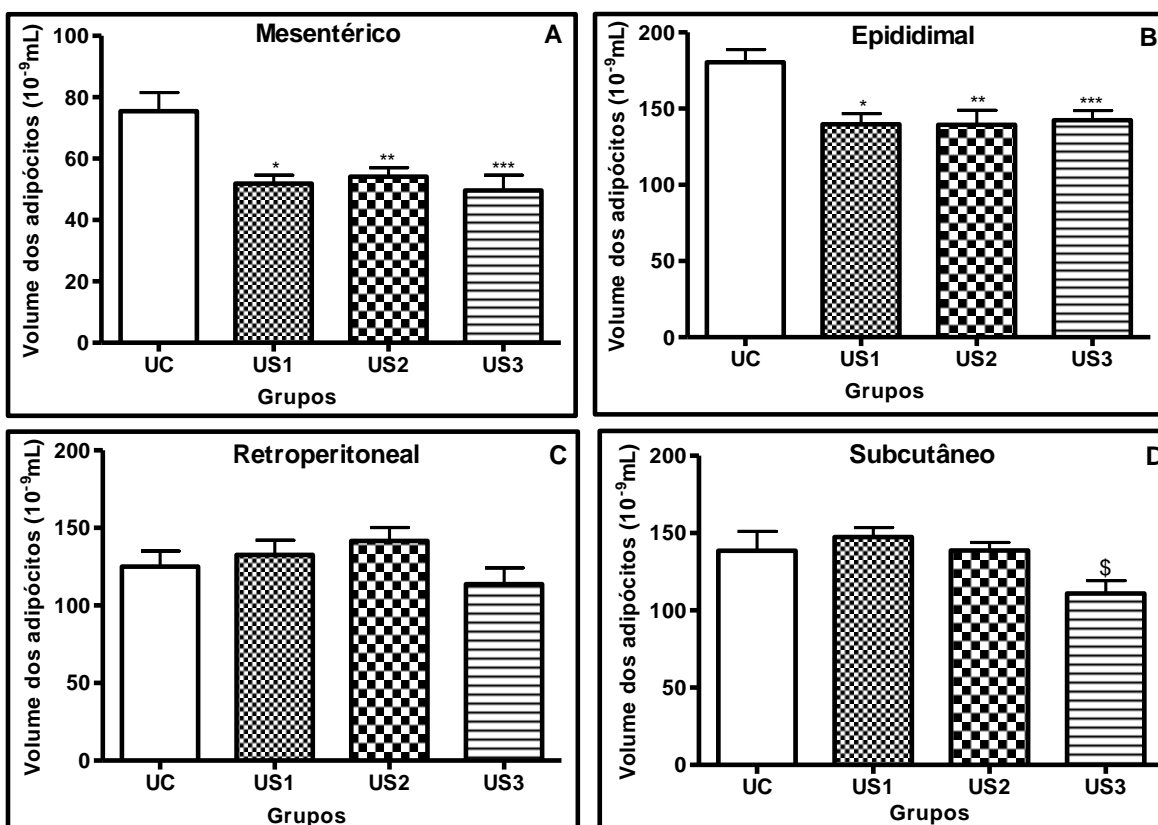




**Figura 10** - Massa (g/100g) de massa corporal de tecido adiposo mesentérico (A), teste K-W=12,01;  $p < 0,01$ , epididimal (B), teste F=5,78;  $p < 0,01$ , retroperitoneal (C), teste F=1,32;  $p = 0,29$ , subcutâneo (D), teste F=3,79;  $p < 0,05$ , visceral total (E), teste F=4,64;  $p < 0,05$  dos grupos experimentais US1, US2 e US3. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. \*US1 vs UC; \*\*US2 vs UC; \*\*\*US3 vs UC, teste de Comparação múltipla de Dunn's ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.3 Análise morfométrica dos tecidos adiposos

O volume dos adipócitos dos tecidos adiposos mesentérico (Figura 11.A), epididimal (Figura 11.B) diminuiu em todos os grupos experimentais em relação ao grupo controle. Entretanto, o volume dos adipócitos do TASC diminuiu apenas no grupo US3 em relação a todos os grupos experimentais (Figura 11.D) e não houve alteração do volume dos adipócitos tecido adiposo retroperitoneal (Figura 11.C).



**Figura 11** - Volume (10<sup>-9</sup>mL) dos adipócitos do tecido adiposo mesentérico (A), teste de K-W= 15,00;  $p < 0,01$ , epididimal (B), teste de K-W= 18,78;  $p < 0,001$ , retroperitoneal (C), teste de K-W= 6,16;  $p > 0,05$  e subcutâneo (D), teste de K-W= 26,70;  $p < 0,0001$  dos grupos experimentais US1, US2 e US3. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. \$US3 vs UC, US1 e US2; \*US1 vs UC; \*\*US2 vs UC; \*\*\*US3 vs UC, teste de Comparação múltipla de Dunn's ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.4 Pressão arterial sistólica

Não houve variações na pressão arterial sistólica em nenhum grupo experimental após 5 e 10 dias de estimulação ultrassônica (Tabela 3).

**Tabela 3** - Pressão arterial sistólica antes e após 10 dias de estimulação ultrassônica dos grupos experimentais UC, US1, US2 e US3.

PAS (mmHg)	Grupos experimentais				p valor
	UC	US1	US2	US3	
Inicial	110±4	107±4	108±5	110±4	0,9654
Final	116±3	111±4	114±4	110±4	0,6893

UC= Terapia ultrassônica controle, US1= Terapia ultrassônica de 1W/cm<sup>2</sup>, US2= Terapia ultrassônica de 2W/cm<sup>2</sup>, US3= Terapia ultrassônica de 3W/cm<sup>2</sup>, PAS= Pressão arterial sistólica. Dados expressos como média ± EPM. p valor do teste de Newman Keuls.

### 5.1.5 Perfil lipídico e metabólico

Apesar de a terapia ultrassônica não ter alterado o colesterol total, o LDL-c aumentou no grupo US1, a relação LDL-c/HDL-c foi maior nos grupos US1 e US2, assim como no grupo US1 em relação ao US3 e o HDL-c diminuiu nos grupos US1, US2, US3. Enquanto os níveis plasmáticos de triglicerídeos não foi alterado em nenhum grupo experimental, os AGL aumentaram no grupo US3 em relação a todos os outros grupos experimentais (Tabela 4).

Todas as potências de terapia ultrassônica aumentaram a glicose plasmática, porém apenas nos grupos US1 e US3 os níveis plasmáticos de insulina aumentaram. Além disso, houve aumento da resistência à insulina no grupo US3, enquanto nos grupos US1 e US3 a sensibilidade à insulina determinada pelo QUICKI-IR foi menor do que nos grupos UC e US2. Entretanto, a área sob a curva (AUC), o HOMA-β e o índice QUICKI não sofreram alterações

após a utilização das distintas potências ultrassônicas nos grupos experimentais (Tabela 4).

**Tabela 4** - Perfil lipídico e metabólico dos grupos experimentais UC, US1, US2 e US3 após 10 sessões de terapia ultrassônica

	Grupos experimentais				
	UC	US1	US2	US3	p valor
CT (mg/dL)	251,2±3,9	243,6±3,0	227,8±9,0	247,8±15,8	0,2103
LDL-C (mg/dL)	140,6±7,6	166,8±5,5*	155,8±6,8	161,0±4,2	0,0486
HDL-C (mg/dL)	81,0±5,3	46,4±2,5*	47,2±4,2**	59,6±1,3***	<0,0001
LDL-c/HDL-c	2,1±0,3	3,6±0,3 <sup>#</sup>	3,4±0,3**	2,7±0,1	0,0017
TAG (mg/dL)	150,6±15,7	153,0±18,0	123,5±7,5	136,8±9,6	0,4554
AGL	3,3±0,5	5,9±0,7	3,4±0,8	23,8±0,8 <sup>\$</sup>	<0,0001
Glicose (mg/dL)	97,8±5,0	166,2±13,1*	179,4±21,8**	182,2±3,5***	0,0052
AUC	13299±289	12397±358	13023±550	14255±834	0,1347
Insulina (ng/mL)	1,0±0,1	2,5±0,2*	1,8±0,2	2,6±0,4***	0,0023
HOMA-IR	5,7±0,9	26,8±6,5	23,7±4,2	29,5±5,0***	0,0046
HOMA-β	325,6±83,9	176,9±20,5	257,7±60,4	219,2±5,2	0,3812
QUICKI	0,29±0,01	0,26±0,01	0,27±0,01	0,25±0,01	0,2249
QUICKI-R	0,35±0,01	0,28±0,01 <sup>##</sup>	0,32±0,01	0,27±0,02 <sup>##</sup>	0,0017

UC= Terapia ultrassônica controle, US1= Terapia ultrassônica de 1W/cm<sup>2</sup>, US2= Terapia ultrassônica de 2W/cm<sup>2</sup>, US3= Terapia ultrassônica de 3W/cm<sup>2</sup>, CT= Colesterol total, LDL= Lipoproteína de baixa densidade, HDL= Lipoproteína de alta densidade, TAG= Triacilglicerol, AGL= ácidos graxos livres em (x10mmol/L), AUC= Área sob a curva em (mg/dL x 90min), HOMA-IR= Modelo de avaliação homeostática de resistência insulínica, HOMA-β= Modelo de avaliação homeostática da capacidade funcional das células β, QUICKI= Índice quantitativo de verificação da sensibilidade à insulina, QUICKI-R= Índice quantitativo revisado de verificação da sensibilidade à insulina. Dados expressos como média ± EPM. Análises paramétricas por Anova one-way, pós teste de Newman Keuls e não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns: p<0,05; \*US1 vs UC; \*\*US2 vs UC; \*\*\*US3 vs UC; <sup>#</sup>US1 vs US3; <sup>##</sup>US1, US3 vs UC, US2; <sup>\$</sup>US3 vs UC, US1, US2.

### 5.1.6 Correlações

Foi observado que a massa corporal está associada positivamente com a massa de TASC. Da mesma forma, as massas de TAME e TASC foram correlacionadas com o volume dos seus respectivos adipócitos (Tabela 5).

**Tabela 5** – Associações entre a massa corporal e dos tecidos adiposos subcutâneo abdominal e visceral total dos grupos experimentais US1, US2 e US3

	Massa corporal (g)		
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
TASC	0,3343	-0,023 a 0,615	0,032*
TAV	0,4382	0,069 a 0,701	0,011*
Massa do tecido adiposo subcutâneo (g)			
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
Vol. dos adipócitos (10 <sup>-9</sup> mL)	0,6625	0,297 a 0,858	0,0010*
Massa do tecido adiposo mesentérico (g)			
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
Vol. dos adipócitos (10 <sup>-9</sup> mL)	0,5231	0,036 a 0,809	0,0188*

TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal (g/100g de massa corporal), TAV= Tecido adiposo visceral total (g/100g de massa corporal), R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC = Intervalo de confiança. Diferença significativa: \*p<0,05.

No grupo US1, o LDL-c se associou negativamente com as massas do TASC (R=-0,8126, IC=-0,9872 a 0,2463, p=0,0473), TAE (R=-0,8092, IC=-0,9869 a 0,2557, p=0,0486) e TAME (R=-0,8605, IC=-0,9907 a 0,0908, p=0,0306), a razão LDL-c/HDL-c com a massa de TAME (R=-0,9059, IC=-0,9938 a -0,1172, p=0,0171). Os ácidos graxos livres se associaram negativamente com a massa de TASC apenas no grupo US1 (R=-0,8314, IC=-0,9744 a -0,2092, p=0,0102). Apesar dos ácidos graxos livres não terem se associado com a glicose plasmática, foram correlacionados positivamente com o HOMA-IR e negativamente com o QUICKI-revisado (Tabela 6). Além disso, os ácidos graxos

livres se associaram, positivamente, com a insulina plasmática no grupo US3 (R=0,9800, IC= 0,7214 a 0,9987, p=0,0017).

**Tabela 6** - Associações entre a glicose, área sob a curva do teste de tolerância à glicose, insulina e índices de resistência insulínica dos grupos experimentais US1, US2 e US3

	AGL (x10mmol/L)		
	R	IC (95%)	p valor
Glicose (mg/dL)	-0,0040	-0,458 a 0,450	0,4922
Insulina (ng/mL)	0,0762	-0,337 a 0,465	0,3617
HOMA-IR	0,3803	-0,075 a 0,704	0,0491*
QUICKI-R	-0,7511	-0,886 a 0,498	<0,0001*

UC= Terapia ultrassônica controle, US1= Terapia ultrassônica de 1W/cm<sup>2</sup>, US2= Terapia ultrassônica de 2W/cm<sup>2</sup>, US3= Terapia ultrassônica de 1W/cm<sup>2</sup>, AGL= Ácidos graxos livres, QUICKI-R= Índice quantitativo revisado de verificação da sensibilidade à insulina, HOMA-IR= Modelo de avaliação homeostática de resistência insulínica, R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC = Intervalo de confiança. Diferença significativa: \*p<0,05.

## 5.2 Treinamento físico associado ou não a terapia ultrassônica

Neste experimento, foi utilizada a potência média de 3W/cm<sup>2</sup> na estimulação ultrassônica, a qual foi utilizada nos grupos experimentais NU e TU.

### 5.2.1 Trabalho realizado nos testes de exaustão

A avaliação da performance física após o primeiro teste de exaustão não apontou diferenças entre o trabalho realizado pelos 4 grupos experimentais de animais (NS, NU, TS e TU). Durante o segundo teste de exaustão foi percebido que o trabalho executado pelos animais do grupo TS foi maior do que dos animais

do grupo NS, assim como o trabalho do grupo TU foi maior do que no grupo NU. No terceiro teste de exaustão, a performance física dos animais do grupo TS e TU foi maior do que dos animais dos grupos NS e NU (Tabela 7).

**Tabela 7** - Trabalho realizado nos testes de exaustão de ratos machos submetidos à realização ou não de treinamento físico e terapia ultrassônica

Grupos experimentais					
TE	NS	NU	TS	TU	p valor
1°	22,1±4,2	18,5±2,9	23,5±1,7	17,7±3,9	0,6285
2°	15,3±4,8	8,0±2,3	43,7±5,1 <sup>a</sup>	43,2±5,6 <sup>c</sup>	<0,0001 <sup>t</sup> 0,4040 <sup>u</sup> 0,4705 <sup>tu</sup>
3°	11,5±4,2	5,2±2,7	61,7±6,4 <sup>b</sup>	49,0±4,5 <sup>d</sup>	<0,0001

TE= Teste de exaustão em KJ, NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom. Dados expressos como média ± EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns ( $p < 0,05$ ) e paramétricas por Anova two way, <sup>t</sup>p valor para treinados vs não treinados; <sup>u</sup>p valor para terapia ultrassônica vs placebo; <sup>tu</sup>p valor para a interação entre a terapia ultrassônica treinamento físico vs placebo, pós teste de Bonferroni ( $p < 0,0001$ ); <sup>a</sup>TS vs NS ( $p < 0,01$ ); <sup>b</sup>TS vs NS, NU; <sup>c</sup>TU vs NU; <sup>d</sup>TU vs NS, NU.

### 5.2.2 Massa corporal e índice de Lee

A massa corporal inicial era semelhante em todos os grupos, mas após as 10 semanas de experimento, a massa corporal foi menor entre os animais do grupo TS e NU em relação ao grupo NS, assim como no grupo TU quando comparados com os ratos do grupo NU, porém sem efeitos aditivos da interação entre as terapias utilizadas. A redução da massa corporal nestes grupos não foi suficiente para alterar o índice de Lee em nenhum grupo experiemntal (Tabela 8).

**Tabela 8** - Trabalho realizado nos testes de exaustão de ratos machos submetidos à realização ou não de treinamento físico e terapia ultrassônica

	Grupos experimentais				p valor
	NS	NU	TS	TU	
Massa inicial (g)	306±9	307±9	301±9	303±12	0,6345 <sup>t</sup> 0,8765 <sup>u</sup> 0,9241 <sup>tu</sup>
Massa final (g)	441±9	394±8 <sup>a</sup>	359±12 <sup>b</sup>	352,5±16 <sup>c</sup>	<0,0001 <sup>t</sup> 0,0262 <sup>u</sup> 0,0910 <sup>tu</sup>
Lee (x10 <sup>-3</sup> )	297±2	291±2	290±2	293±2	0,1585 <sup>t</sup> 0,5026 <sup>u</sup> 0,0465 <sup>tu</sup>

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom, Lee= Índice de Lee. Dados expressos como média ± EPM. Análises paramétricas por Anova two way, <sup>t</sup>p valor para treinados vs não treinados; <sup>u</sup>p valor para terapia ultrassônica vs placebo, pós teste de Bonferroni (p<0,05); <sup>a</sup>NU vs NS; <sup>b</sup>TS vs NS (p<0,001); <sup>c</sup>TU vs NU. No índice de Lee, a interação entre a terapia ultrassônica e o treinamento físico respondeu por aproximadamente 12,43% do total da variância.

### 5.2.3 Massa dos tecidos adiposos mesentérico, epididimal, retroperitoneal, subcutâneo abdominal, visceral total e marrom

Apesar de a massa corporal final, do TASC e TAME ter diminuído nos grupos TS e NU, a massa do tecido adiposo epididimal diminuiu apenas com a associação do treinamento físico com a terapia ultrassônica em comparação com o grupo de animais do grupo TS e a massa do TAR não sofreu alteração em nenhum grupo experimental. A massa do TAB foi menor no grupo TU em comparação com o grupo NS, enquanto a massa do TAV diminuiu nos grupos NU e TS em comparação com o grupo NS, assim como entre os animais do grupo TU em relação ao grupo NU (Tabela 9). Além disso, a massa do TAV e do TASC foi correlacionada positivamente com a massa corporal final (Tabela 10).

A massa do TAMAR foi menor nos grupos TS e TU em relação, respectivamente, aos grupos NS e NU. A massa do fígado dos ratos do grupo TU foi maior do que no grupo NS e a massa das adrenais maior entre os animais do grupo TS em comparação com os ratos do grupo NS (Tabela 9).



**Tabela 9** - Massa (g/100g de massa corporal) dos tecidos adiposos, fígado e glândulas adrenais dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU após a realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica

	Grupos experimentais				p valor
	NS	NU	TS	TU	
TAME	1,0±0,1	0,6±0,1 <sup>a</sup>	0,6±0,1 <sup>c</sup>	0,5±0,1	0,0021 <sup>t</sup> 0,0039 <sup>u</sup> 0,3146 <sup>tu</sup>
TAE	1,2±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	1,0±0,1 <sup>h</sup>	0,3703 <sup>t</sup> 0,0703 <sup>u</sup> 0,0431 <sup>tu</sup>
TAR	1,4±0,2	1,2±0,1	1,2±0,1	0,8±0,1	0,0439 <sup>t</sup> 0,0415 <sup>u</sup> 0,5605 <sup>tu</sup>
TASC	1,8±0,1	1,4±0,1 <sup>a</sup>	1,2±0,1 <sup>d</sup>	1,1±0,2	0,0020 <sup>t</sup> 0,0294 <sup>u</sup> 0,2333 <sup>tu</sup>
TAMAR	11,5±0,7	10,5±0,6	8,8±0,5 <sup>c</sup>	7,2±0,5 <sup>g</sup>	0,0002 <sup>t</sup> 0,0780 <sup>u</sup> 0,6660 <sup>tu</sup>
TAV	4,8±0,5	3,3±0,2 <sup>b</sup>	3,1±0,2 <sup>d</sup>	2,2±0,2 <sup>f</sup>	<0,0001 <sup>t</sup> 0,0006 <sup>u</sup> 0,3079 <sup>tu</sup>
TAB	6,1±0,6	4,7±0,3	4,2±0,2	3,3±0,2 <sup>e</sup>	0,0010
Fígado	2,7±0,2	2,7±0,1	3,1±0,1	3,2±0,1 <sup>e</sup>	0,0246
AD	1,4±0,1	1,4±0,1	1,9±0,2 <sup>c</sup>	1,4±0,1	0,0258

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom. TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo, TAMAR= Tecido adiposo marrom em ( $\times 10^{-2}$ ), TAV= Tecido adiposo visceral total, TAB= Tecido adiposo branco abdominal total; AD= Adrenais direita e esquerda em  $\times 10^{-2}$ . Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns ( $p < 0,05$ ) e paramétricas por Anova two way, <sup>t</sup>p valor para treinados vs não treinados; <sup>u</sup>p valor para terapia ultrassônica vs placebo, pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ); <sup>a</sup>NU vs NS; <sup>b</sup>NU vs NS ( $p < 0,01$ ); <sup>c</sup>TS vs NS; <sup>d</sup>TS vs NS ( $p < 0,01$ ); <sup>e</sup>TU vs NS; <sup>f</sup>TU vs NU; <sup>g</sup>TU vs NU ( $p < 0,01$ ); <sup>h</sup>TU vs TS. A interação entre a terapia ultrassônica e o treinamento físico responde por aproximadamente 16,65% do total da variância na massa do TAE.

**Tabela 10** - Associação entre a massa corporal, do tecido adiposo subcutâneo abdominal e visceral total nos grupos experimentais NS, NU, TS e TU

	Massa corporal (g)		
	R	IC (95%)	p valor
TASC (g/100g de massa corporal)	0,3753	0,114 a 0,663	0,0171*
TAV (g/100g de massa corporal)	0,3457	-0,001 a 0,624	0,0284*

TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal, TAV= Tecido adiposo visceral total. R= Coeficiente de correlação de Pearson. IC= Intervalo de confiança. Diferença significativa: \* $p < 0,05$ .

### 5.2.4 Análise morfométrica dos tecidos adiposos

A interação entre o treinamento físico e terapia ultrassônica diminuiu o volume dos adipócitos do TAME em relação aos grupos NS e NU e do TAR em comparação ao grupo NS, enquanto que o volume dos adipócitos do TASC foi menor nos grupos TU, TS e NU em relação ao grupo NS. Entretanto, o volume dos adipócitos do TAE não sofreu alteração nos grupos experimentais (Tabela 11).

O treinamento físico isolado (grupo TS) reduziu o volume dos adipócitos do TAMAR em relação aos grupos NS e NU e no grupo TU, o volume dos adipócitos do TAMAR foi menor do que no grupo NS. Apesar disso, não foram observados efeitos aditivos da associação entre o treinamento físico e a terapia ultrassônica sobre o volume dos adipócitos do TAMAR e TASC (Tabela 11).

**Tabela 11** - Volume dos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica

	Grupos experimentais				p valor
	NS	NU	TS	TU	
TAME (10 <sup>-9</sup> mL)	239,3±23,0	176,3±8,0	146,5±5,7	130,8±5,5 <sup>c</sup>	<0,0001
TAE (10 <sup>-9</sup> mL)	304,0±16,0	293,0±17,0	271,8±16,0	266,2±11,1	0,2020
TAR (10 <sup>-9</sup> mL)	270,6±17,3	251,0±17,3	239,5±16,6	215,9±12,6 <sup>b</sup>	0,0393
TASC (10 <sup>-9</sup> mL)	339,9±18,8	265,2±15,1 <sup>d</sup>	268,0±15,6 <sup>d</sup>	296,1±13,8 <sup>d</sup>	0,0010
TAMAR (10 <sup>-9</sup> mL)	8,8±0,6	7,3±0,5	5,1±0,3 <sup>a</sup>	6,0±0,4 <sup>b</sup>	<0,0001

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom. TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo, TAMAR= Tecido adiposo marrom. Dados expressos como média ± EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns: p<0,05. <sup>a</sup>TS vs NS, NU; <sup>b</sup>TU vs NS; <sup>c</sup>TU vs NS, NU; <sup>d</sup>TU, TS, NU vs NS.

A interação entre o treinamento físico e terapia ultrassônica diminuiu a elipticidade dos adipócitos do TAME em relação ao grupo NS, enquanto que no TASC, a elipticidade dos adipócitos foi menor nos grupos TU, TS e NU em relação ao grupo NS, sem efeitos aditivos da associação das terapias. Contudo, no TAR e TAE não houve alterações na elipticidade dos adipócitos em nenhum grupo experimental. Ademais, a elipticidade dos adipócitos do TAMAR adipócitos foi menor nos grupos TS e TU em relação ao grupo NS, não havendo efeitos da associação das terapias (Tabela 12).

**Tabela 12** - Elipticidade dos adipócitos nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica

	Grupos experimentais				P valor
	NS	NU	TS	TU	
TAME	0,94±0,01	0,88±0,01	0,89±0,01	0,87±0,01 <sup>a</sup>	0,0154
TAE	0,91±0,02	0,88±0,01	0,93±0,01	0,85±0,01	0,0631
TAR	0,92±0,01	0,89±0,01	0,88±0,01	0,87±0,01	0,5545
TASC	1,14±0,01	0,96±0,01 <sup>c</sup>	0,98±0,01 <sup>c</sup>	1,01±0,01 <sup>c</sup>	<0,0001
TAMAR	1,01±0,02	0,92±0,02	0,91±0,02 <sup>b</sup>	0,90±0,02 <sup>b</sup>	0,0041

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom. TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo, TAMAR= Tecido adiposo marrom. Dados expressos como média ± EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns ( $p < 0,05$ ); <sup>a</sup>TU vs NS; <sup>b</sup>TU, TS vs NS; <sup>c</sup>TU, TS, NU vs NS.

A interação entre o treinamento físico e terapia ultrassônica diminuiu o número de adipócitos do TAME e TAE em relação a todos os outros grupos experimentais e a terapia ultrassônica isolada também determinou a redução do número de adipócitos do TAE em comparação com o grupo NS. Enquanto que no TAR não houve diferença no número de adipócitos em nenhum grupo experimental, no TASC, o número de adipócitos foi menor nos grupos NU e TU em relação ao TS e NS, mas sem efeitos aditivos das terapias utilizadas (Tabela

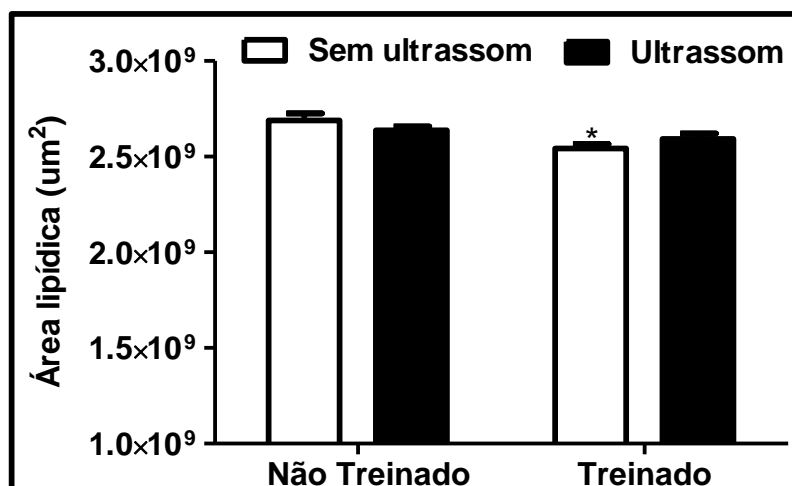
13). Além disso, observou-se associações positivas entre a massa e o volume dos adipócitos do TAME ( $R=0,4615$ ,  $IC= 0,3888$  a  $0,5285$ ,  $p<0,0001$ ) e TASC ( $R=0,3775$ ,  $IC=0,2954$  a  $0,4541$ ,  $p<0,0001$ ), assim como entre a massa e o número de adipócitos do TAE ( $R= 0,3326$ ,  $IC= 0,2464$  a  $0,4136$ ,  $p<0,0001$ ).

**Tabela 13** - Estimativa do número de adipócitos nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica

	Grupos experimentais				P valor
	NS	NU	TS	TU	
TAME ( $\times 10^7$ )	1,07 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,05	1,02 $\pm$ 0,07	0,78 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	<0,0001
TAE ( $\times 10^7$ )	0,44 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,06	0,13 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	<0,0001
TAR ( $\times 10^7$ )	2,43 $\pm$ 0,34	2,45 $\pm$ 0,22	2,50 $\pm$ 0,24	2,49 $\pm$ 0,21	0,1404
TASC ( $\times 10^7$ )	1,32 $\pm$ 0,13	0,91 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	1,37 $\pm$ 0,13	0,99 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	0,0002

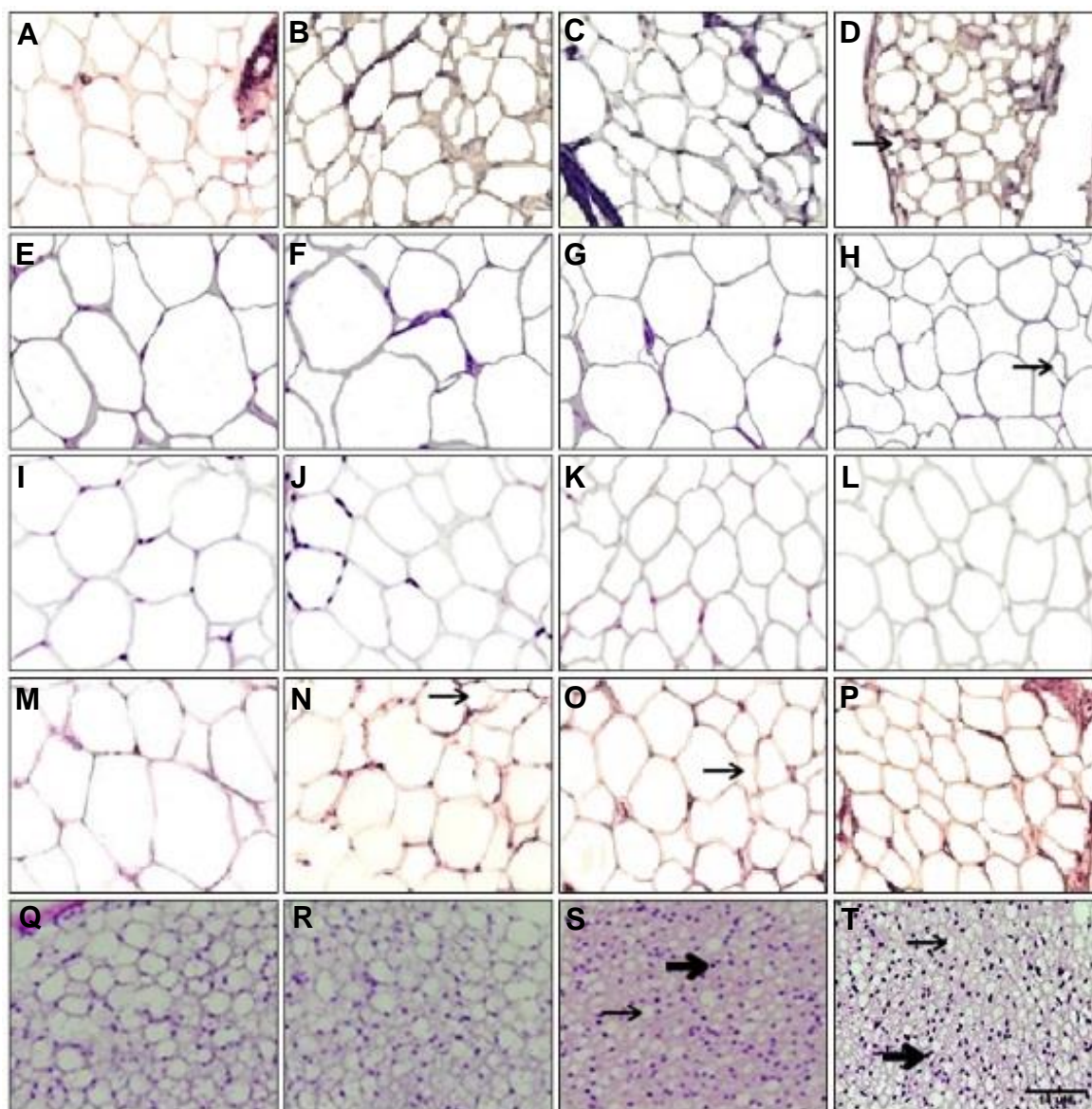
NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom. TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns ( $p<0,05$ ); <sup>a</sup>NU vs NS; <sup>b</sup>NU vs NS, TS; <sup>c</sup>TU vs NS, TS; <sup>d</sup>TU vs NS, NU, TS.

Assim como o volume e a elipticidade, a área lipídica dos adipócitos do TAMAR foi menor com o treinamento físico isolado em comparação com o grupo NS, conforme a figura 12.



**Figura 12** - Área lipídica no tecido adiposo marrom dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU após a realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica, teste de K-W= 9,279; p=0,0258. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Pós-teste de Comparação múltipla de Dunn's (p<0,05). \*TS vs NS.

As fotomicrografias de cortes corados com hematoxilina e eosina demonstram a redução do volume do vacúolo dos adipócitos do TAME (Figura 13.D) e TAR (Figura 13.H) com a associação das terapias e do volume dos adipócitos do TASC com a terapia ultrassônica (Figura 13.N) e treinamento físico isolado (Figura 13.O). Nas fotomicrografias 13.S e 13.T é possível observar a redução do volume do vacúolo dos adipócitos e o aumento da coloração granular eosinofílica do TAMAR.



**Figura 13** - Fotomicrografias ilustrativas dos adipócitos corados com hematoxilina e eosina do tecido adiposo mesentérico nos grupos NS (A), NU (B), TS (C) e TU (D), retroperitoneal nos grupos NS (E), NU (F), TS (G) e TU (H), epididimal nos grupos NS (I), NU (J), TS (K) e TU (L), subcutâneo nos grupos NS (M), NU (N), TS (O) e TU (P) e marrom nos grupos NS (Q), NU (R), TS (S) e TU (T), em aumento de 20x. Barra contendo a escala equivalente a 14 $\mu$ M na figura 13.T utilizada como referência para todas as imagens. Notar a redução do volume do vacúolo do adipócito indicado por seta em 13.D, 13.H, 13.N, 13.O, 13.S e 13.T, assim como o destaque com seta espessa para a coloração granular eosinofílica em 13.S e 13.T.

### 5.2.5 Perfil lipolítico e lipogênico dos tecidos adiposos

Os níveis de RNAm do receptor  $\beta_3$ -adrenérgico aumentaram no grupo TS em relação ao NS no TAME, TAR e TASC, assim como no grupo TU em comparação com o grupo NS no TAR e TAE e em relação ao grupo NU no TAME e TAE. Entretanto, apenas no TAE a associação entre o treinamento físico e a terapia ultrassônica determinou efeito aditivo sobre a expressão gênica do receptor  $\beta_3$ -adrenérgico (Tabela 14).

Em continuidade com a sequência de sinalização lipolítica, a expressão gênica de PKA aumentou com o treinamento isolado (grupo TS) em comparação com o grupo NS no TAME, TAE e TAR e com o grupo NU no TASC. No grupo TU, a expressão gênica de PKA foi maior em relação ao grupo NU no TAE e TASC e menor do que o grupo TS no TAE, porém sem efeitos aditivos entre as terapias em nenhum tecido adiposo analisado (Tabela 14). Além disso, as respectivas expressões gênicas de PKA e do receptor  $\beta_3$ -adrenérgico nos grupos experimentais foram associadas positivamente no TAME, TAE e TASC (Tabela 15).

A expressão gênica de HSL aumentou no grupo TS em relação ao NS no TAE e TASC, enquanto que no grupo TU a expressão gênica dessa proteína foi maior do que no grupo NU no TAME, TAE e TAR. Além disso, a interação entre o treinamento físico e a terapia ultrassônica determinou efeitos aditivos de aumento e diminuição da expressão gênica da HSL, respectivamente, no TAME e TASC em relação ao treinamento físico isolado (Tabela 16). Verificou-se, também, que a expressão gênica dessa proteína no TAME e TASC foi associada negativamente com as respectivas massas desses tecidos e com a concentração de ácidos graxos livres (Tabela 15).

**Tabela 14** - Expressão gênica do receptor  $\beta_3$ -adrenérgico e proteína quinase A nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica

<b>Grupos experimentais</b>					
<b>Rec. <math>\beta_3</math>-adrenérgico (u.d.a)</b>	<b>NS</b>	<b>NU</b>	<b>TS</b>	<b>TU</b>	<b>P valor</b>
TAME (x10)	0,96±0,03	1,15±0,05	1,58±0,07 <sup>a</sup>	1,66±0,01 <sup>d</sup>	<0,0001 <sup>t</sup> 0,0335 <sup>u</sup> 0,3705 <sup>tu</sup>
TAE (x10)	0,70±0,03	0,65±0,03	0,93±0,04	1,02±0,01 <sup>e</sup>	0,0018
TAR (x10)	0,91±0,01	0,95±0,02	1,08±0,06 <sup>a</sup>	1,08±0,01 <sup>c</sup>	0,0040
TASC (x10)	0,62±0,02	0,97±0,02	1,10±0,03 <sup>a</sup>	0,96±0,01	0,0013
<b>Grupos experimentais</b>					
<b>PKA (u.d.a)</b>	<b>NS</b>	<b>NU</b>	<b>TS</b>	<b>TU</b>	<b>P valor</b>
TAME (x10)	2,51±0,38	3,25±0,27	3,63±0,25 <sup>a</sup>	2,53±0,05	0,0244
TAE (x10)	1,54±0,05	1,39±0,10	2,35±0,10 <sup>a</sup>	1,94±0,15 <sup>df</sup>	<0,0001 <sup>t</sup> 0,0178 <sup>u</sup> 0,2371 <sup>tu</sup>
TAR (x10)	2,02±0,02	3,25±0,27	3,72±0,24 <sup>a</sup>	2,62±0,01	0,0014
TASC (x10)	2,86±0,03	2,78±0,10	3,74±0,21 <sup>b</sup>	3,67±0,13 <sup>d</sup>	0,0018

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom. PKA= Proteína quinase A, TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo, TAMAR= Tecido adiposo marrom, u.d.a.= Unidades densitométricas arbitrárias. Dados expressos como média ± EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns ( $p < 0,05$ ); ANOVA two-way, <sup>t</sup>p valor para treinados vs não treinados; <sup>u</sup>p valor para terapia ultrassônica vs placebo, pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>TS vs NS; <sup>b</sup>TS vs NU; <sup>c</sup>TU vs NS; <sup>d</sup>TU vs NU; <sup>e</sup>TU vs NS, NU; <sup>f</sup>TU vs TS.



**Tabela 15** - Correlação de Pearson entre a expressão gênica do receptor  $\beta_3$ -adrenérgico e PKA e entre HSL, PKA, as massas dos tecidos adiposos mesentérico, epididimal e subcutâneo e ácidos graxos livres nos grupos experimentais NS, NU, TS e TU

<b>Receptor <math>\beta_3</math>-adrenérgico (u.d.a.)</b>			
	<b>R</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>p valor</b>
PKA (TAME)	0,7466	0,2656 a 0,9300	0,0041*
PKA (TAE)	0,6828	0,2827 a 0,8805	0,0018*
PKA (TASC)	0,6404	0,1662 a 0,8740	0,0068*
<b>Lipase hormônio sensível (HSL) (u.d.a)</b>			
	<b>R</b>	<b>IC (95%)</b>	<b>p valor</b>
PKA (TAME)	0,8567	0,1479 a 0,9841	0,0147*
PKA (TAE)	0,9323	0,8118 a 0,9767	<0,0001*
PKA (TASC)	0,6331	0,0533 a 0,8936	0,0183*
Massa (TAME)	-0,5831	-0,8506 a -0,0759	0,0143*
Massa (TAE)	-0,1908	-0,6551 a 0,3782	0,2568
Massa (TASC)	-0,6254	-0,0664 a 0,9111	0,0358*
AGL <sup>1</sup>	0,5585	-0,0624 a 0,8677	0,0371*
AGL <sup>2</sup>	0,5738	-0,1314 a 0,5378	0,0255*

AGL<sup>1</sup>= Correlação de ácidos graxos livres com HSL no TAME, AGL<sup>2</sup>= Correlação de ácidos graxos livres com HSL no TASC, HSL= Lipase hormônio sensível, TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal, PKA= Proteína quinase A, u.d.a.= Unidades densitométricas arbitrárias, R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC= Intervalo de confiança. Diferença significativa: \*p<0,05.

A expressão gênica de ATGL aumentou com a terapia ultrassônica (grupo NU) e treinamento físico isolado (grupo TS), respectivamente, no TAME e TASC. Contudo, a interação entre os tratamentos reduziu e aumentou os níveis de RNAm dessa proteína, respectivamente no TAME e TAR (Tabela 16).

A lipogênese determinada pela expressão gênica da LPL diminuiu no TAME nos grupos TS e TU em relação, respectivamente, aos grupos NS e NU, assim como no TASC nos grupos TS e TU e no TAR no grupo NU em comparação com o grupo NS, porém sem efeitos interativos entre as terapias (Tabela 17). Além disso, a expressão gênica da LPL e HSL no TASC foi associada de forma positiva e negativa, respectivamente, com a insulina plasmática (Tabela 18).

**Tabela 16** - Expressão gênica da lipase hormônio sensível (HSL) e lipase de triglicerídeos (ATGL) nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica

<b>Grupos experimentais</b>					
<b>HSL (u.d.a)</b>	<b>NS</b>	<b>NU</b>	<b>TS</b>	<b>TU</b>	<b>P valor</b>
TAME (x10)	7,20±0,22	7,25±0,17	7,60±0,01	8,49±0,01 <sup>e</sup>	0,0002 <sup>t</sup> 0,0137 <sup>u</sup> 0,0250 <sup>tu</sup>
TAE (x10)	5,00±0,22	4,40±0,16	6,03±0,03 <sup>b</sup>	6,02±0,01 <sup>c</sup>	<0,0001 <sup>t</sup> 0,1907 <sup>u</sup> 0,1992 <sup>tu</sup>
TAR (x10)	6,10±0,06	5,44±0,12	5,65±0,04	6,37±0,02 <sup>c</sup>	0,0280
TASC (x10)	5,60±0,06	5,40±0,11	6,88±0,03 <sup>b</sup>	5,90±0,01 <sup>d</sup>	<0,0001 <sup>t</sup> 0,0025 <sup>u</sup> 0,0307 <sup>tu</sup>
<b>Grupos experimentais</b>					
<b>ATGL (u.d.a)</b>	<b>NS</b>	<b>NU</b>	<b>TS</b>	<b>TU</b>	<b>P valor</b>
TAME (x10)	2,70±0,07	3,29±0,08 <sup>a</sup>	2,58±0,10	2,2±0,19 <sup>c</sup>	0,0001 <sup>t</sup> 0,3899 <sup>u</sup> 0,0011 <sup>tu</sup>
TAE (x10)	1,92±0,04	1,70±0,09	2,27±0,16	2,05±0,15	0,0107 <sup>t</sup> 0,0890 <sup>u</sup> 0,9902 <sup>tu</sup>
TAR (x10)	2,46±0,17	2,28±0,02	2,93±0,08	3,03±0,21 <sup>c</sup>	0,0068
TASC (x10)	1,87±0,25	2,77±0,29	3,42±0,39 <sup>b</sup>	3,02±0,07	0,0227

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom. HSL= Lipase hormônio sensível, ATGL= Lipase de triglicerídeos, TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo, TAMAR= Tecido adiposo marrom, u.d.a.= Unidades densitométricas arbitrárias. Dados expressos como média ± EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns (p<0,05); ANOVA two-way, <sup>t</sup>p valor para treinados vs não treinados; <sup>u</sup>p valor para terapia ultrassônica vs placebo, pós teste de Bonferroni (p<0,05). <sup>a</sup>NU vs NS; <sup>b</sup>TS vs NS; <sup>c</sup>TU vs NU; <sup>d</sup>TU vs TS; <sup>e</sup>TU vs NU, TS. A interação entre a terapia ultrassônica e o treinamento físico responde por aproximadamente 11,54%, 3,23%, 8,85% do total da variância, respectivamente na expressão gênica da HSL no TAME, TAE e TASC e por 27,38% do total da variância na expressão gênica da ATGL no TAME.

**Tabela 17** - Expressão gênica da lipoproteína lipase (LPL) nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica

LPL (u.d.a.)	Grupos experimentais				p valor
	NS	NU	TS	TU	
TAME (x10)	2,41±0,17	2,25±0,05	1,84±0,10 <sup>b</sup>	1,72±0,08 <sup>d</sup>	0,0001 <sup>t</sup> 0,2117 <sup>u</sup> 0,8607 <sup>tu</sup>
TAE (x10)	1,28±0,03	1,13±0,10	1,32±0,02	1,26±0,02	0,2856
TAR (x10)	1,86±0,06	1,54±0,07 <sup>a</sup>	1,77±0,03	1,58±0,05	0,0112
TASC (x10)	8,99±0,69	6,08±0,16	2,60±0,28 <sup>b</sup>	1,98±0,08 <sup>c</sup>	0,0006

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom. LPL= Lipoproteína lipase, TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo, TAMAR= Tecido adiposo marrom, u.d.a.= Unidades densitométricas arbitrárias. Dados expressos como média ± EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns ( $p < 0,05$ ); ANOVA two-way, <sup>t</sup>p valor para treinados vs não treinados; <sup>u</sup>p valor para terapia ultrassônica vs placebo, pós teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>NU vs NS; <sup>b</sup>TS vs NS; <sup>c</sup>TU vs NS; <sup>d</sup>TU vs NU.

**Tabela 18** - Correlação de Pearson entre a insulina plasmática e a expressão gênica da HSL e LPL no TASC dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU

	Insulina plasmática (ng/mL)		
	R	IC (95%)	p valor
HSL (TASC)	-0,6829	-0,0476 a 0,9811	0,0213*
LPL (TASC)	0,5812	-0,0765 a 0,8865	0,0390*

HSL= Lipase hormônio sensível, LPL= Lipoproteína lipase, TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal, R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC= Intervalo de confiança. Diferença significativa: \* $p < 0,05$ .

### 5.2.6 Perfil bioquímico-metabólico e hormonal

A terapia ultrassônica isolada (grupo NU) aumentou os níveis plasmáticos de colesterol total, insulina e o índice HOMA-IR, enquanto o treinamento físico isolado (grupo TS) não alterou o perfil bioquímico-metabólico dos animais do experimento. Além disso, no grupo TU, a concentração dos triglicerídeos plasmáticos foi menor do que no grupo NU e a interação do treinamento físico com a terapia ultrassônica determinou a melhora da tolerância à glicose mensurada pela AUC em comparação com os animais do grupo NU e aumento do LDL-c em relação ao grupo NS (Tabela 19).

A testosterona total plasmática aumentou no grupo TS em comparação com o NU e NS, porém a interação entre o treinamento físico e terapia ultrassônica determinou a redução desse hormônio e o aumento do cortisol plasmático (Tabela 20), o qual foi associado positivamente com a massa das glândulas adrenais (Tabela 21). Além disso, a testosterona foi associada positivamente com a insulina plasmática e a expressão gênica de HSL no TASC e negativamente com o cortisol plasmático e a massa do TASC (Tabela 21).

Apesar da concentração do estradiol plasmático não ter sido alterada entre os grupos experimentais, a razão entre o estradiol e a testosterona aumentou entre os animais do grupo NU em relação ao grupo NS. A leptina plasmática diminuiu nos grupos NU e TS em relação ao grupo NS (Tabela 20).

**Tabela 19** - Perfil bioquímico-metabólico dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica

	Grupos experimentais				
	NS	NU	TS	TU	p valor
CT (mg/dL)	170,7±2,5	191,4±4,7 <sup>b</sup>	179,0±3,6	190,1±2,1	0,3203 <sup>t</sup> <0,0001 <sup>u</sup> 0,1659 <sup>tu</sup>
HDL-c (mg/dL)	76,6±9,4	88,2±3,0	80,4±10,2	76,8±10,0	0,6724 <sup>t</sup> 0,6621 <sup>u</sup> 0,3942 <sup>tu</sup>
LDL-c (mg/dL)	79,0±2,6	83,0±3,8	86,2±1,2	107,6±7,0 <sup>c</sup>	0,0108
LDL-c/HDL-c	1,0±0,1	0,9±0,1	1,1±0,1	1,2±0,2	0,2996
TAG (mg/dL)	76,1±6,2	99,7±7,2	60,7±5,3	72,3±5,9 <sup>d</sup>	0,0024 <sup>t</sup> 0,0102 <sup>u</sup> 0,3527 <sup>tu</sup>
AGL (x10nmol/L)	1,4±0,3	0,7±0,2	1,2±0,3	1,1±0,4	0,7363 <sup>t</sup> 0,2820 <sup>u</sup> 0,2982 <sup>tu</sup>
Glicose (mg/dL)	117,9±4,8	134,4±3,4	117,3±4,2	122,3±3,7	0,0244
AUC (mg/dLx90min)	13407±314	15437±632	14110±840	12918±431 <sup>d</sup>	0,1271 <sup>t</sup> 0,4732 <sup>u</sup> 0,0097 <sup>tu</sup>
Insulina (ng/mL)	0,7±0,2	1,9±0,1 <sup>b</sup>	0,8±0,1	1,3±0,2	0,2029 <sup>t</sup> <0,0001 <sup>u</sup> 0,0658 <sup>tu</sup>
QUICKI	0,27±0,04	0,27±0,01	0,25±0,04	0,28±0,02	0,9360
QUICKI-R	0,30±0,02	0,27±0,01	0,28±0,01	0,28±0,01	0,6564 <sup>t</sup> 0,3358 <sup>u</sup> 0,1817 <sup>tu</sup>
HOMA-IR	9,8±2,3	17,3±0,9 <sup>a</sup>	10,3±1,5	13,2±1,9	0,3275 <sup>t</sup> 0,0089 <sup>u</sup> 0,2033 <sup>tu</sup>
HOMA-β	274,0±37,5	267,8±7,9	253,7±39,3	279,0±21,4	0,8964
IL-6 (pg/mL)	46,4±7,0	80,7±4,3 <sup>a</sup>	72,6±1,0	82,2±6,7 <sup>c</sup>	0,0119
PCR (mg/L)	0,63±0,02	0,64±0,02	0,68±0,02	0,68±0,02	0,4264

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom, CT= Colesterol total, HDL-c= Lipoproteína de alta densidade, LDL-c= Lipoproteína de baixa densidade, TAG= Triacilglicerol, AGL= ácidos graxos livres, AUC= Área sob a curva do teste de tolerância à glicose, QUICKI= Índice quantitativo de verificação da sensibilidade à insulina, QUICKI-R= Índice quantitativo revisado de verificação da sensibilidade à insulina, HOMA-IR= Modelo de avaliação homeostática de resistência insulínica, HOMA-β= Modelo de avaliação homeostática da capacidade funcional das células β, IL-6= Interleucina-6, PCR= Proteína C reativa. Dados expressos como média ± EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns (p<0,05); ANOVA two-way, <sup>t</sup>p valor para treinados vs não treinados; <sup>u</sup>p valor para terapia ultrassônica vs placebo, pós teste de Bonferroni (p<0,05); <sup>a</sup>NU vs NS; <sup>b</sup>NU vs NS (p<0,001); <sup>c</sup>TU vs NS; <sup>d</sup>TU vs NU. A interação entre a terapia ultrassônica e o treinamento físico responde por aproximadamente 21,86%, do total da variância da AUC.

**Tabela 20** - Perfil hormonal após realização ou não do treinamento físico e de terapia ultrassônica

	Grupos experimentais				p valor
	NS	NU	TS	TU	
Cortisol (ug/dL)	0,1±0,1	0,2±0,2	0,4±0,2	1,0±0,3 <sup>d</sup>	0,0352
T <sub>2</sub> (ng/dL)	156,5±31,4	100,1±23,5	240,4±36,1 <sup>c</sup>	102,5±12,4 <sup>d</sup>	0,0289
E <sub>2</sub> (pg/mL)	9,0±0,2	9,8±0,9	9,0±0,2	9,0±0,2	0,9612
E <sub>2</sub> /T <sub>2</sub>	0,04±0,01	0,11±0,01 <sup>a</sup>	0,04±0,01	0,13±0,03	0,0045
Leptina (ng/mL)	5,8±1,0	2,9±0,3 <sup>a</sup>	2,5±0,1 <sup>b</sup>	3,3±0,5	0,0282 <sup>t</sup>
					0,0890 <sup>u</sup> 0,0890 <sup>tu</sup>

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados sem Ultrassom, TU= Treinados com Ultrassom, testosterona em ng/dL, E<sub>2</sub>= Estradiol, T<sub>2</sub>= testosterona. Dados expressos como média ± EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns (p<0,05); ANOVA two-way, <sup>t</sup>p valor para treinados vs não treinados; <sup>u</sup>p valor para terapia ultrassônica vs placebo, pós teste de Bonferroni (p<0,01). <sup>a</sup>NU vs NS; <sup>b</sup>TS vs NS; <sup>c</sup>TS vs NU, NS; <sup>d</sup>TU vs NS. A interação entre a terapia ultrassônica e o treinamento físico responde por aproximadamente 27,12% do total da variância na massa da testosterona.

**Tabela 21** - Correlação de Pearson entre a testosterona total e o cortisol, insulina plasmática, massa e expressão gênica de HSL no TASC, TNF-α no TAME dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU

	Testosterona total (ng/dL)		
	R	IC (95%)	p valor
Cortisol (µg/dL)	-0,5191	-0,8072 a -0,0313	0,0197*
Insulina (ng/mL)	0,5131	-0,4452 a -0,1205	0,0176*
Massa do TASC (g)	-0,6845	-0,9184 a -0,0963	0,0145*
HSL no TASC (u.d.a.)	0,6224	0,0358 a 0,8900	0,0204*
TNF-α no TAME (u.d.a)	-0,5833	-0,8183 a -0,1243	0,0232*

	Cortisol (µg/dL)		
	R	IC (95%)	p valor
Massa das Adrenais (g)	0,4921	0,1202 a 0,7428	0,0062*

HSL= Lipase hormônio sensível, TAME= Tecido adiposo mesentérico, TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal, TNF-α= Fator de necrose tumoral alfa, u.d.a.= Unidades densitométricas arbitrárias, R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC= Intervalo de confiança. Diferença significativa: \*p<0,05.

### 5.2.7 Perfil inflamatório sistêmico e hepático

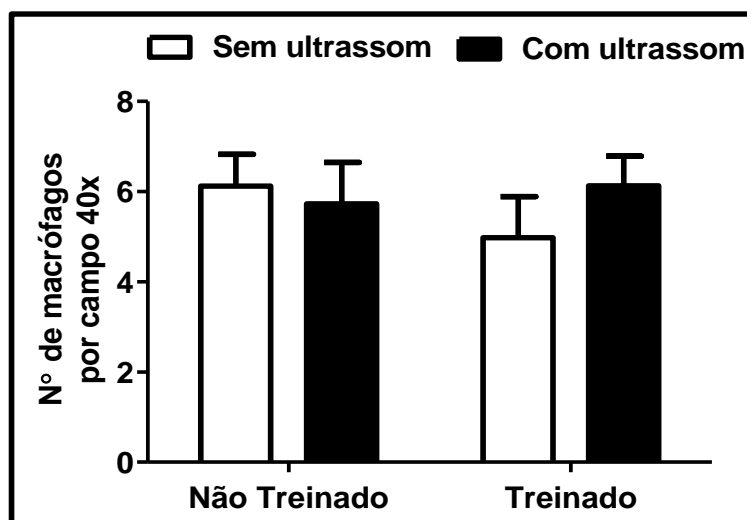
A análise da concentração de proteína C reativa não apontou diferenças entre os grupos experimentais, em contraste com os níveis plasmáticos de IL-6 que foram maiores nos grupos NU e TU em comparação com o NS, mas sem efeitos aditivos da interação do treinamento físico com a terapia ultrassônica (Tabela 19). Nos animais do grupo NU, foi verificada uma associação positiva entre a IL-6 e insulina plasmática (Tabela 22).

**Tabela 22** - Correlação de Pearson entre a insulina plasmática e IL-6 plasmática e número de macrófagos infiltrados no TASC dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU

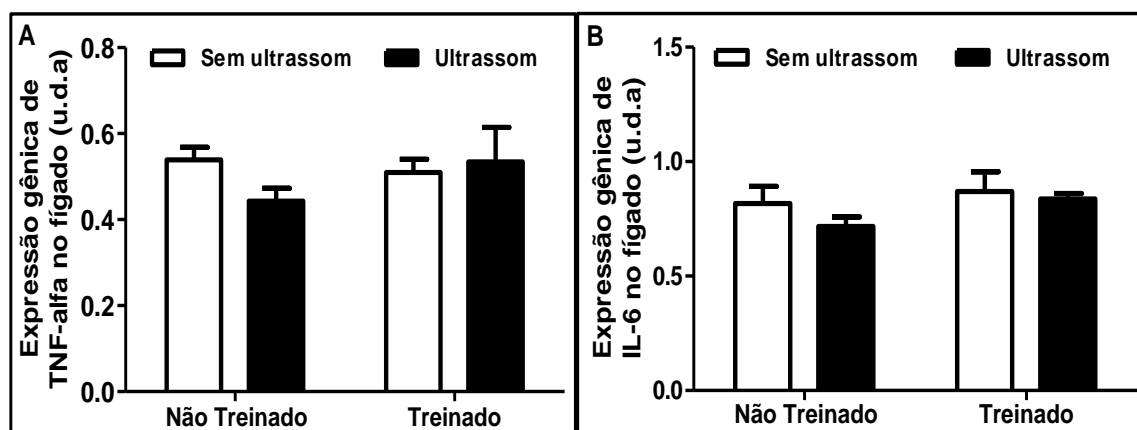
	Insulina plasmática (ng/mL)		
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
IL-6 plasmática (pg/mL)	0,9999	0,9988 a 1,0000	<0,0001*
Macrófagos no TASC	0,5851	-0,0706 a 0,8878	0,0378*

IL-6= Interleucina-6, TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal, R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC= Intervalo de confiança. Diferença significativa: \*p<0,05.

Não foram encontradas alterações no número de micro ou macrovesículas de gordura (dados não mostrados), assim como de macrófagos marcados com o antígeno anti-ED1 no fígado em nenhum grupo experimental (Figura 14). Da mesma forma, não foram observadas mudanças na expressão gênica de TNF- $\alpha$  (Figura 15.A) e IL-6 no tecido hepático (Figura 15.B).



**Figura 14** - Número de macrófagos no tecido hepático dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU após a realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica, teste F= 1,22;  $p=0,6515$  para a variável treinamento físico e teste F= 1,29,  $p=0,6428$  para a variável terapia ultrassônica. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Pós-teste de Bonferroni ( $p<0,05$ ).

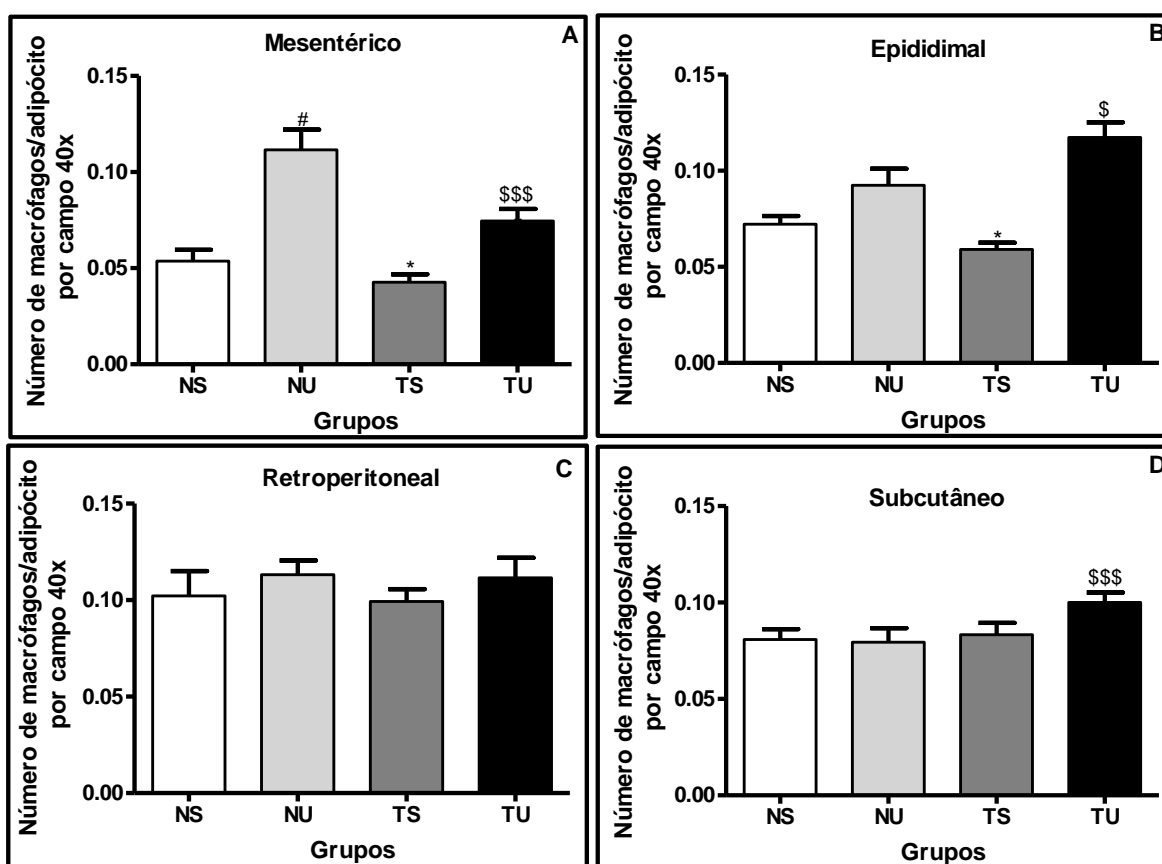


**Figura 15** - Expressão gênica de TNF- $\alpha$  (A) e IL-6 (B) no fígado dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU após a realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica, teste F= 2,96;  $p=0,5231$  para a variável treinamento físico e teste F= 3,90,  $p=0,4652$  para a variável terapia ultrassônica (TNF- $\alpha$ ) e teste K-W=3,589,  $p=0,3094$  (IL-6). Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Pós-teste de Comparação múltipla de Dunn's e Bonferroni ( $p<0,05$ ).



### 5.2.8 Perfil inflamatório dos tecidos adiposos

No TAME, a terapia ultrassônica isolada aumentou o número de macrófagos infiltrados por adipócito/campo de 40x em comparação com o grupo NS, enquanto que a associação do treinamento físico com a terapia ultrassônica aumentou essa contagem em relação aos grupos NS e TS e diminuiu em comparação com o grupo NU (Figura 16.A).



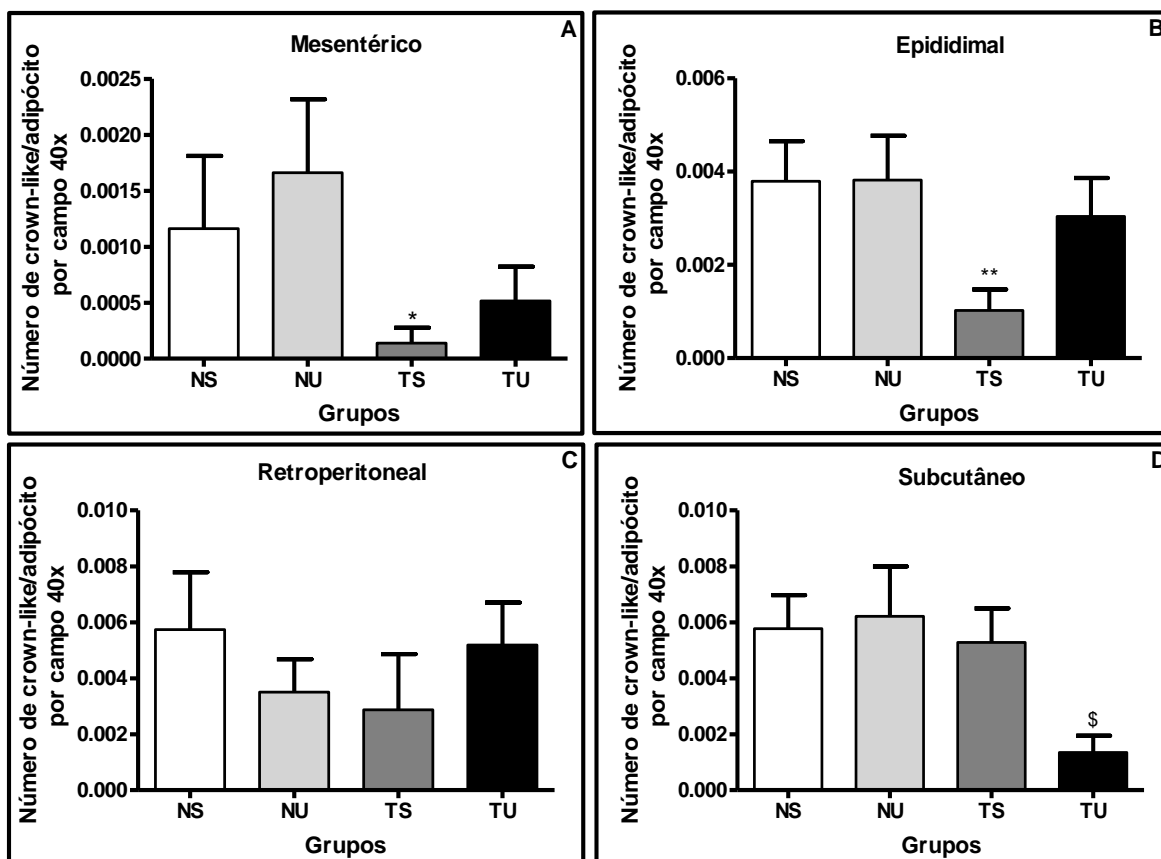
**Figura 16** - Número de macrófagos por adipócito, campo de 40x, nos diferentes grupos experimentais após 10 semanas de treinamento físico ou placebo associado ou não à terapia ultrassônica no tecido adiposo mesentérico (A), teste de K-W= 62,29,  $p < 0,0001$ , epididimal (B), teste de K-W= 46,50,  $p < 0,0001$ , retroperitoneal (C), teste de K-W= 3,303,  $p = 0,3473$  e subcutâneo (D), teste de K-W=17,31,  $p = 0,0006$ . Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Pós-teste de Comparação múltipla de Dunn's ( $p < 0,05$ ). <sup>#</sup>NU vs NS; <sup>\*</sup>TS vs NU; <sup>\$</sup>TU vs NU; <sup>\$\$\$</sup>TU vs NS, NU, TS.

A interação entre o treinamento físico e a terapia ultrassônica aumentou a quantidade de macrófagos infiltrados por adipócito/campo de 40x no TAE em comparação com o grupo NU (Figura 16.B). Entretanto, no TAR não houve diferenças na quantidade de macrófagos em nenhum grupo experimental (Figura 16.C).

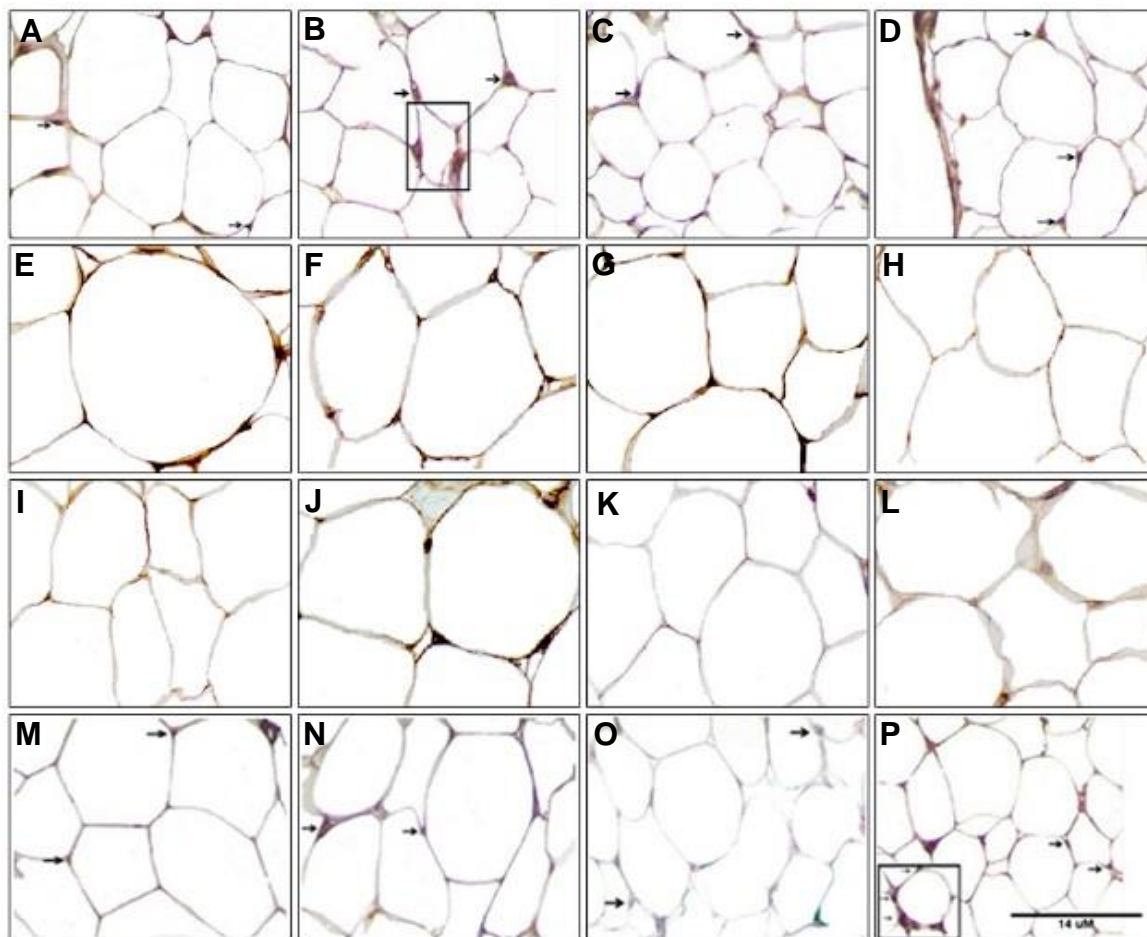
No TASC, a interação entre as terapias aumentou o número de macrófagos infiltrados por adipócito/campo de 40x em comparação com os ratos dos grupos NS, NU e TS (Figura 16.D). Ademais, o número de macrófagos infiltrados no TASC foi associado positivamente com a insulina plasmática (Tabela 22).

Em comparação com os animais submetidos à terapia ultrassônica isolada, o número de estruturas *crown-like* no TAME e TAE entre os animais do grupo TS foi menor do que no grupo NU (Figura 17.A). O treinamento físico isolado também diminuiu o número de estruturas *crown-like* no TAE em relação ao grupo NS (Figura 17.B), enquanto que a interação entre os tratamentos reduziu o número de estruturas *crown-like* no TASC em comparação com o NS (Figura 17.D). Entretanto, no TAR não houve alteração da contagem do número de estruturas *crown-like* em nenhum grupo experimental (Figura 17.C).

Nas fotomicrografias 18.A, 18.B, 18.C e 18.D encontram-se representadas imagens da imuno-histoquímica para ED-1 no tecido adiposo mesentérico, respectivamente, dos NS, NU, TS e TU, sendo possível observar um maior número de macrófagos nos adipócitos dos grupos NU e TU e a presença de mais de uma célula ED-1+ em torno de um adipócito no retângulo em destaque na figura 18.B. Nas figuras 18.E, 18.F, 18.G e 18.H são representadas as imagens da imuno-histoquímica para ED-1 no tecido adiposo retroperitoneal, enquanto que as figuras 18.I, 18.J, 18.K e 18.L representam as imagens do mesmo experimento no tecido adiposo epididimal. Nas fotomicrografias 18.M, 18.N, 18.O e 18.P são apresentadas as imagens das lâminas da imuno-histoquímica para macrófagos no TASC, respectivamente, dos grupos NS, NU, TS e TU, sendo possível a observação do maior número de macrófagos infiltrados no grupo TU, assim como a presença de uma estrutura *crown-like* em destaque no retângulo da Figura 18.P.



**Figura 17** - Número de estruturas *crown-like* por adipócito, campo de 40x, nos diferentes grupos experimentais após 10 semanas de treinamento físico ou placebo associado ou não à terapia ultrassônica no tecido adiposo mesentérico (A), teste de K-W= 7,589,  $p=0,0226$ , epididimal (B), teste de K-W= 8,949,  $p=0,0300$ , retroperitoneal (C), teste de K-W= 5,221,  $p=0,0735$  e subcutâneo (D), teste de K-W= 5,605,  $p=0,1325$ . Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Pós-teste de Comparação múltipla de Dunn's ( $p<0,05$ ). \*TS vs NU; \*\*TS vs NS, NU; \$TU vs NS.



**Figura 18** - Fotomicrografias ilustrativas da imuno-histoquímica para macrófagos no tecido adiposo mesentérico nos grupos NS (A), NU (B), TS (C) e TU (D), no tecido adiposo retroperitoneal nos grupos NS (E), NU (F), TS (G) e TU (H), no tecido adiposo epididimal nos grupos NS (I), NU (J), TS (K) e TU (L), e no tecido adiposo subcutâneo nos grupos NS (M), NU (N), TS (O) e TU (P) em aumento de 40x. Exemplos da marcação de células ED-1 positivas indicadas com setas preenchidas com preto e estruturas semelhantes à *crown-like* indicadas por um retângulo em destaque no aumento de 40x em 19.B e 19.P. Barra contendo a escala equivalente a 14µM na figura 19.P utilizada como referência para todas as imagens.

A expressão gênica do marcador inflamatório IL-6 aumentou no TAME em relação ao grupo NS, enquanto que no TASC, a expressão gênica de IL-6 foi maior no grupo NU e TU, respectivamente em relação ao grupo NS e TS, mas sem efeitos interativos entre as terapias utilizadas. No TAE, a expressão gênica desse marcador inflamatório diminuiu após o treinamento físico isolado (grupo TS) em comparação com os grupos NS e NU e a interação entre os tratamentos empregados aumentou a expressão gênica de IL-6 em comparação com o grupo TS (Tabela 23).

A IL-6 plasmática foi associada positivamente com a expressão gênica da IL-6 no TASC nos grupos experimentais (Tabela 24), além de com a expressão gênica desse marcador inflamatório no TAME ( $R=0,6236$ ,  $IC= 0,0356$  a  $0,6943$ ,  $p=0,0492$ ) no grupo NU. Ainda nesse grupo específico, a expressão gênica de IL-6 foi associada positivamente com o respectivo número de macrófagos no TAME e com a insulina plasmática no TAE e TASC (Tabela 25). Salienta-se que a expressão gênica de IL-6 no TAME, TAE e TASC também foi correlacionada positivamente com a massa dos seus respectivos tecidos adiposos (Tabela 26).

A realização do treinamento físico, isoladamente, determinou a redução da expressão gênica do TNF- $\alpha$  no TAE em comparação com o grupo NS, no TAME e TASC em comparação com o grupo NS e NU. No TAE, a expressão gênica do TNF- $\alpha$  no grupo TU foi menor do que no grupo NU, mas sem efeitos aditivos da interação entre as terapias utilizadas. Em contraste, no TAME, a interação entre o treinamento físico e a terapia ultrassônica determinou o aumento da expressão desse marcador inflamatório em comparação com a realização apenas do treinamento físico (Tabela 23).

A expressão gênica de TNF- $\alpha$  no TAME foi negativamente associada aos níveis plasmáticos de testosterona (Tabela 21) e positivamente com o número de macrófagos neste tecido nos grupos experimentais (Tabela 24). Entre os animais do grupo TU, houve fortes associações entre a insulina plasmática e a expressão gênica de TNF- $\alpha$  no TAE e TASC (Tabela 27) e no grupo TS, entre a expressão gênica desse marcador inflamatório no TAME com a leptina plasmática ( $R= 0,9166$ ,  $IC= 0,1790$  a  $0,9946$ ),  $p=0,0143$ . Ademais, a expressão gênica de TNF- $\alpha$  no TAME, TAE, TAR e TASC foi correlacionada positivamente com a massa dos seus respectivos tecidos adiposos (Tabela 26).

**Tabela 23** - Expressão gênica de IL-6 e TNF-alfa nos tecidos adiposos dos grupos experimentais após realização ou não do treinamento físico e da terapia ultrassônica

<b>Grupos experimentais</b>					
<b>IL-6 (u.d.a)</b>	<b>NS</b>	<b>NU</b>	<b>TS</b>	<b>TU</b>	<b>P valor</b>
TAME (x100)	3,84±0,18	4,39±0,06 <sup>a</sup>	4,08±0,11	4,12±0,28	0,0409
TAE (x100)	4,68±0,31	4,41±0,22	2,29±0,11 <sup>c</sup>	3,60±0,19 <sup>e</sup>	<0,0001 <sup>t</sup> 0,0306 <sup>u</sup> 0,0026 <sup>tu</sup>
TAR (x100)	3,44±0,27	4,06±0,12	3,99±0,08	4,54±0,22	0,0148 <sup>t</sup> 0,0075 <sup>u</sup> 0,8399 <sup>tu</sup>
TASC (x100)	4,91±0,15	5,82±0,25 <sup>a</sup>	4,22±0,18	5,48±0,33 <sup>e</sup>	0,0004 <sup>t</sup> 0,0513 <sup>u</sup> 0,4802 <sup>tu</sup>
<b>Grupos experimentais</b>					
<b>TNF-α (u.d.a)</b>	<b>NS</b>	<b>NU</b>	<b>TS</b>	<b>TU</b>	<b>P valor</b>
TAME (x100)	3,09±0,19	3,35±0,04	2,53±0,12 <sup>c</sup>	3,36±0,15 <sup>e</sup>	0,0177
TAE (x100)	2,78±0,11	3,21±0,21	1,87±0,12 <sup>b</sup>	2,20±0,16 <sup>d</sup>	<0,0001 <sup>t</sup> 0,0290 <sup>u</sup> 0,7656 <sup>tu</sup>
TAR (x100)	2,86±0,29	2,88±0,36	2,70±0,10	3,55±0,09	0,1004
TASC (x100)	4,40±0,16	4,54±0,20	2,44±0,11 <sup>c</sup>	3,48±0,04	0,0014

NS= Não treinados e sem Ultrassom, NU= Não treinados e com Ultrassom, TS= Treinados e sem Ultrassom, TU= Treinados e com Ultrassom. IL-6= Interleucina-6, TNF-α= Fator de necrose tumoral alfa, TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo, TAMAR= Tecido adiposo marrom, u.d.a.= Unidades densitométricas arbitrárias. Dados expressos como média ± EPM. Análises não paramétricas por Kruskal-Wallis, pós teste de comparações múltiplas de Dunns (p<0,05); ANOVA two-way, <sup>t</sup>p valor para treinados vs não treinados; <sup>u</sup>p valor para terapia ultrassônica vs placebo, pós teste de Bonferroni (p<0,05). <sup>a</sup>NU vs NS; <sup>b</sup>TS vs NS; <sup>c</sup>TS vs NS, NU; <sup>d</sup>TU vs NU; <sup>e</sup>TU vs TS. A interação entre a terapia ultrassônica e o treinamento físico responde por aproximadamente 14,61% do total da variância na massa da expressão gênica de IL-6 no TAE.

**Tabela 24** – Associações entre IL-6 plasmática e a expressão gênica de IL-6 no tecido adiposo branco e entre a expressão gênica de TNF- $\alpha$  e o número de macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU

	IL-6 plasmática (pg/mL)		
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
Expressão gênica de IL-6 no TAME (u.d.a.)	0,0784	-0,5473 a 0,6479	0,4093
Expressão gênica de IL-6 no TAE (u.d.a.)	-0,1365	-0,7056 a 0,5396	0,3535
Expressão gênica de IL-6 no TAR (u.d.a.)	-0,1832	-0,7056 a 0,4682	0,2949
Expressão gênica de IL-6 no TASC (u.d.a.)	0,5475	0,1385 a 0,7970	0,0062*
	Expressão gênica de TNF- $\alpha$ no TAME (u.d.a.)		
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
Macrófagos infiltrados no TAME	0,6296	-0,0002 a 0,9018	0,0255*
	Expressão gênica de TNF- $\alpha$ no TAE (u.d.a.)		
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
Macrófagos infiltrados no TAE	-0,1434	-0,7703 a 0,6245	0,3674
	Expressão gênica de TNF- $\alpha$ no TAR (u.d.a.)		
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
Macrófagos infiltrados no TAR	0,0015	-0,2820 a 0,6847	0,3995
	Expressão gênica de TNF- $\alpha$ no TASC (u.d.a.)		
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
Macrófagos infiltrados no TASC	-0,2647	-0,8171 a 0,5410	0,2632

IL-6= Interleucina-6, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAME= Tecido adiposo mesentérico; TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal, TNF- $\alpha$ = Fator de necrose tumoral alfa, u.d.a.= Unidades densitométricas arbitrárias, R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC = Intervalo de confiança. Diferença significativa: \* $p < 0,05$ .

**Tabela 25** – Associações entre a expressão gênica de IL-6 e macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco e insulina plasmática do grupo experimental NU

	Expressão gênica de IL-6 (u.d.a)		
	R	IC (95%)	p valor
Macrófagos infiltrados no TAME	0,8665	0,1849 a 0,9852	0,0128*
Macrófagos infiltrados no TAE	0,2393	-0,9374 a 0,9760	0,3803
Macrófagos infiltrados no TAR	0,1962	-0,9427 a 0,9737	0,4019
Macrófagos infiltrados no TASC	-0,5817	-0,9896 a 0,8605	0,2091
	Insulina plasmática (ng/mL)		
	R	IC (95%)	p valor
Exp. gênica de IL-6 no TAME (u.d.a)	-0,7374	-0,9940 a 0,7681	0,1313
Exp. gênica de IL-6 no TAE (u.d.a)	0,9947	0,7636 a 0,9999	0,0026*
Exp. gênica de IL-6 no TAR (u.d.a)	-0,1414	-0,9706 a 0,9487	0,4293
Exp. gênica de IL-6 no TASC (u.d.a)	0,8548	-0,1119 a 0,9903	0,0325*

Exp.= Expressão, IL-6= Interleucina-6, TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal, TAME= Tecido adiposo mesentérico, u.d.a.= Unidades densitométricas arbitrárias, R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC = Intervalo de confiança. Diferença significativa: \*p<0,05.

**Tabela 26** - Correlação de Pearson entre a massa dos depósitos adiposos e a respectiva expressão gênica de IL-6 e TNF-alfa dos grupos experimentais NS, NU, TS e TU

	Massa do tecido adiposo (g)		
	R	IC (95%)	p valor
Expressão de IL-6 TAME (u.d.a)	0,9937	0,9838 a 0,9976	<0,0001*
Expressão de IL-6 TAE (u.d.a)	0,9935	0,9833 a 0,9975	<0,0001*
Expressão de IL-6 TAR (u.d.a)	0,9938	0,9840 a 0,9976	< 0,0001
Expressão de IL-6 TASC (u.d.a)	0,9936	0,9834 a 0,9975	<0,0001*
Expressão de TNF- $\alpha$ TAME (u.d.a)	0,5296	-0,0638 to 0,8463	0,0383*
Expressão de TNF- $\alpha$ TAE (u.d.a)	0,5193	-0,0445 a 0,8322	0,0345*
Expressão de TNF- $\alpha$ TAR (u.d.a)	-0,3022	-0,6940 a 0,2278	0,1277
Expressão de TNF- $\alpha$ TASC (u.d.a)	0,4787	-0,0445 a 0,7959	0,0355*

IL-6= Interleucina-6, TNF- $\alpha$ = Fator de necrose tumoral do tipo alfa, TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAE= Tecido adiposo epididimal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal, R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC= Intervalo de confiança. Diferença significativa: \*p<0,05.



**Tabela 27** – Associações entre a expressão gênica de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo branco e insulina plasmática do grupo experimental TU

	Insulina plasmática (ng/mL)		
	<i>R</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>p valor</i>
Exp. gênica de TNF- $\alpha$ no TAME (u.d.a.)	-0,3707	-0,8111 a 0,3379	0,1458
Exp. gênica de TNF- $\alpha$ no TAE (u.d.a.)	0,8665	-0,0673 a 0,9911	0,0287*
Exp. gênica de TNF- $\alpha$ no TAR (u.d.a.)	0,2683	-0,4818 a 0,7915	0,2425
Exp. gênica de TNF- $\alpha$ no TASC (u.d.a.)	0,9896	0,5834 a 0,9998	0,0052*

Exp.= Expressão, TAE= Tecido adiposo epididimal, TAME= Tecido adiposo mesentérico, TAR= Tecido adiposo retroperitoneal, TASC= Tecido adiposo subcutâneo abdominal, TNF- $\alpha$ = Fator de necrose tumoral alfa, u.d.a.= Unidades densitométricas arbitrárias, R= Coeficiente de correlação de Pearson, IC = Intervalo de confiança. Diferença significativa: \* $p < 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Projeto piloto

Nos três grupos experimentais US1, US2 e US3, após as 10 sessões de terapia ultrassônica, independente da potência ultrassônica utilizada, houve redução do ganho de massa corporal o que corrobora com Gonçalves et al. (2009a). A redução do ganho de massa corporal foi associada positivamente com a diminuição da massa do TASC, algo que também foi verificado por Moreno-Moraga e colaboradores (2007).

A diminuição da massa de diferentes tecidos adiposos (TASC, TAME, TAE) e a manutenção do TAR, tecido adiposo mais profundo, demonstra a influência do ultrassom de 3MHZ em diferentes profundidades no percurso de seu campo de atuação, o qual atinge profundidades de meio valor de 0,8 a 1,6cm (DRAPER; CASTEL; CASTEL, 1995).

A redução da massa do TASC, TAME e TAE foi acompanhada por diminuição do volume dos respectivos adipócitos, demonstrando que a ação da terapia ultrassônica está relacionada com o trofismo celular. A associação dos efeitos cavitacionais do ultrassom sobre a destruição mecânica de adipócitos já é bem estabelecida (BROWN et al., 2009), mas a terapia ultrassônica também desencadeia efeitos lipolíticos no tecido adiposo por meio do aumento da secreção de norepinefrina pelas terminações nervosas simpáticas da região do corpo irradiada por esse recurso fisioterapêutico (MIWA et al., 2002).

O aumento dos ácidos graxos livres com a terapia ultrassônica de  $3W/cm^2$ , assim como a sua associação negativa com a massa de TASC, sugere a influência adrenérgica do ultrassom. Além disso, é possível que o aumento dos ácidos graxos livres seja decorrente da lipólise do TASC, o qual contribui com a maior parte dos ácidos graxos da circulação sistêmica (HOROWITZ, 2003).

Uma parte dos ácidos graxos e glicerol liberados pela hidrólise dos triglicerídeos após a estimulação com a terapia ultrassônica pode ter sido utilizada para a produção de energia e com conseqüente, redução da gordura corporal. Isto é possível, pois a energia sonora emitida pelo cabeçote ultrassônica é bem absorvida pelo músculo esquelético (DRAPER; SUNDERLAND, 1993) e determina o aumento na expressão gênica de UCP3 e UCP2 (KOGURE et al., 2005).

Outra parte dos ácidos graxos liberados com a estimulação ultrassônica e mantidos circulantes na circulação sanguínea sistêmica pode ter determinado o aumento da glicose plasmática nos grupos sob terapia ultrassônica. O aumento dos ácidos graxos livres promovidos pela lipólise após a estimulação ultrassônica em ratos parece contribuir para a diminuição da tolerância à glicose e desenvolvimento de resistência insulínica (GONÇALVES et al., 2009a). Nesse estudo piloto foi observada a tendência de desenvolvimento de intolerância à glicose e aumento da resistência à insulina em ratos inaptos fisicamente, avaliada pelo índice HOMA-IR com a potência de  $3\text{W}/\text{cm}^2$ , além de diminuição da sensibilidade à insulina (QUICKI-R) nos grupos US1 e US3.

A resistência insulínica está relacionada com doenças cardiovasculares e é um dos sinais da síndrome metabólica, a qual inclui ainda, hipertensão arterial e dislipidemia (QUEIROZ et al., 2009). A estimulação ultrassônica como recurso lipolítico tem apresentado resultados controversos em relação ao perfil lipídico após a realização da terapia (MORENO-MORAGA et al., 2007; GONÇALVES et al., 2009a). Nesse estudo, todas as potências ultrassônicas utilizadas reduziram o HDL-c, enquanto que apenas as potências de 1 e  $2\text{W}/\text{cm}^2$  aumentaram a relação LDL-c/HDL-c. Além disso, o aumento do LDL-c no grupo US1 foi associado, negativamente, com a diminuição da massa de distintos tecidos adiposos, o que demonstra que apesar da melhora estética por redução do ganho de massa corporal e de TASC, o ultrassom pode contribuir para o surgimento de fatores de risco para doenças cardiovasculares e metabólicas.

Apesar de a potência de  $3\text{W}/\text{cm}^2$  ter determinado alterações no metabolismo da glicose e homeostase da insulina, foi a única que reduziu a massa e o volume dos adipócitos do TASC, o principal alvo das terapias de redução da adiposidade abdominal. Sendo assim, admitiu-se a potencia de  $3\text{W}/\text{cm}^2$  para ser utilizada na

terapia ultrassônica a ser associada ou não ao treinamento físico de intensidade moderada.

## 6.2 Treinamento físico associado ou não a terapia ultrassônica

No presente estudo, foi testada a hipótese de que tanto o treinamento físico quanto a terapia ultrassônica reduziriam a massa corporal e dos tecidos adiposos abdominais, mas que os animais submetidos a terapia ultrassônica isolada e treinamento físico poderiam apresentar, respectivamente, alterações negativas e positivas no metabolismo da glicose, homeostase da insulina, perfil inflamatório e lipídico. Sendo assim, a realização simultânea destas terapias poderia reverter esses agravos à saúde dos animais. Para tal, foram investigadas as diferenças na concentração, resistência e sensibilidade à insulina, dislipidemias, níveis sistêmicos de IL-6, proteína C reativa, quantificação de macrófagos e expressão gênica de IL-6 e TNF-alfa no tecido adiposo e hepático, e sinalização lipolítica com o treinamento físico em esteira e terapia ultrassônica.

O treinamento físico em esteira isolado aumentou a performance física, a expressão gênica de marcadores lipolíticos nos tecidos adiposos viscerais e subcutâneo, a testosterona total e reduziu a massa corporal final, dos tecidos adiposos visceral e subcutâneo, expressão gênica de LPL TAME e TASC, estruturas *crown-like* e expressão gênica de IL-6 e TNF- $\alpha$  no TAE, assim como de TNF- $\alpha$  no TASC e TAME. Em contrapartida, a terapia ultrassônica isolada diminuiu a massa corporal final, dos tecidos adiposos visceral e TASC, a expressão gênica de LPL no TAR e aumentou o colesterol total, a insulina e IL-6 plasmática, resistência à insulina, número de macrófagos no TAME, expressão de IL-6 no TAME e TASC e não alterou a expressão gênica dos marcadores lipolíticos.

A associação do treinamento físico com a terapia ultrassônica reduziu o volume dos adipócitos do TAME e TAR, a testosterona total plasmática e aumentou o LDL-c, cortisol e o número de macrófagos infiltrados no TAME e TASC, mas diminuiu o número de estruturas *crown-like* no TASC. Em comparação com o grupo submetido à terapia ultrassônica isolada, a interação entre as terapias reduziu o volume dos

adipócitos do TAME, a expressão gênica de ATGL no TAME, o número de macrófagos infiltrados no TAME e aumentou a tolerância à glicose, a expressão gênica do receptor  $\beta_3$ -adrenérgico no TAE, HSL no TAME, ATGL no TAR e o número de macrófagos infiltrados no TAE e TASC. Em relação ao treinamento físico isolado, a associação dos tratamentos diminuiu a massa do TAE, mas aumentou a expressão gênica de HSL no TAME e TASC, de IL-6 no TAE e TNF- $\alpha$  no TAME e o número de macrófagos infiltrados no TAME e TASC.

A escolha de realizar o presente estudo com ratos baseou-se na evidência que esses animais mimetizam as respostas dos parâmetros bioquímicos plasmáticos (GOUTIANOS et al., 2015) e teciduais avaliados com as terapias utilizadas em nosso estudo. A semelhança fisiológica das respostas ao exercício em esteira elétrica entre ratos e humanos indica que o uso de dados bioquímicos e teciduais de ratos para a pesquisa em fisiologia é justificado. Além disso, a necessidade de controle da alimentação, temperatura e de realização de atividades físicas da vida diária, justificam a necessidade do uso de cobaias na pesquisa dos efeitos da terapia ultrassônica sobre o metabolismo do tecido adiposo.

A seleção dos animais aptos para esse estudo desprezou os animais considerados como de baixo desempenho (inaptos), de forma que foram incluídos na amostra os animais (58,82%) que corriam na esteira elétrica por um tempo mínimo de 5 min a 10 m/min com a esteira inclinada a 15° sem interrupções por mais que 10 segundos. Essa seleção é de suma importância a fim de excluir os animais que possam ter sofrido a influência da seleção natural de forma a preservar características de baixa capacidade aeróbica intrínseca (QUINTÃO JUNIOR et al., 2012). Maiores medidas de massa corporal têm sido correlacionadas com baixo desempenho físico em ratos em relação à distância corrida e essa característica é originada por um componente genético pleiotrópico (KOCH; BRITTON, 2001).

Durante o primeiro teste de exaustão, a performance física avaliada pelo tempo de exercício necessário para fadiga não diferiu entre os grupos experimentais, porém depois de 4 e 8 semanas do protocolo de treinamento físico em esteira, os animais apenas treinados aumentaram a capacidade física, enquanto que a incipiente redução da performance física nos animais sedentários e submetidos à terapia ultrassônica foi revertida com a associação com o treinamento físico desde as 4 primeiras semanas de exercício. O protocolo de treinamento físico foi adaptado

de estudo prévio (NUNES-SILVA et al., 2014), sendo que a realização do exercício com 60% de intensidade é considerada como de intensidade moderada (CARNEIRO-JUNIOR et al., 2013) e 100% de duração garante que a adaptação ao treinamento de *endurance* seja alcançado (LIMA; COIMBRA; MARUBAYASHI, 1998).

Justifica-se a realização de três testes de exaustão tanto pelo ajuste da capacidade física individual com o treinamento quanto pelo fato das terapias utilizadas interferirem com a massa corporal dos animais. Isto ocorre, pois, a massa do animal no dia da avaliação é considerada no cálculo do desempenho, diferentemente de protocolos que consideram apenas o tempo total ou distância percorrida durante o exercício. Além disso, esta equação considera todas as forças e velocidades proporcionais, respectivamente, a massa corporal e a velocidade de corrida, possibilitando que a energia mecânica se torne igual ao produto da velocidade pela massa e o desempenho físico do rato seja medido por uma quantidade proporcional ao trabalho mecânico (OLIVEIRA, 2013). Nesta equação, a exaustão foi considerada quando o animal interrompeu a sessão de treinamento físico (10 segundos sem manter a corrida) devido as altas intensidades de exercício atingidas que não permitem o suprimento de oxigênio suficiente para as altas taxas de trabalho dos músculos, promovendo a anaerobiose da musculatura esquelética e a subsequente interrupção do exercício (NOAKES, 2000).

Neste estudo foi usado um protocolo de corrida em esteira com velocidade inicial de 10m/min com aumentos de 1m/min a cada 3 minutos. A escolha de um protocolo de exercício progressivo, com aumentos rápidos e constantes da velocidade, associado a inclinação de 15° da esteira, possibilitou a diminuição do tempo total de exercício (média de 22 minutos), bem como a possibilidade de lesões nas patas e unhas dos animais durante a corrida e permitiu que os ratos corressem próximos de sua velocidade máxima ao final do protocolo de treinamento (MITCHELL; SPROULE; CHAPMAN, 1958; COSTILL; THOMASON; ROBERTS, 1973; DRUMMOND, 2014). Ademais, o protocolo de exercício progressivo atende a premissa de que o consumo de oxigênio aumenta linearmente em função da velocidade da corrida em ratos (BROOKS; WHITE, 1978).

A eficácia do protocolo de exercício progressivo utilizado neste estudo pode ser averiguada, pelos resultados dos testes de exaustão como descrito anteriormente,

mas também, pela avaliação da massa das adrenais que aumentou entre os animais treinados fisicamente. A hipertrofia das glândulas adrenais também foi observada com o treinamento físico progressivo de baixa intensidade (50% do  $VO_{2máx}$ ) após 12 semanas com 5 sessões semanais (LANA; PAULINO; GONÇALVES, 2006).

Segundo Parizkova e Stanková (1964), o aumento da massa das glândulas adrenais é um indicador confiável para verificar o efeito estressor do exercício físico. Após a realização do treinamento físico por várias semanas, a amígdala é estimulada e então, há liberação do hormônio liberador de corticotropina pelo hipotálamo (RIVEST; RICHARD, 1990), seguido pela rápida ativação do sistema hipófise-adrenais e o aumento da massa das glândulas adrenais (SOTHMANN et al., 1996), principalmente na região cortical fascicular e reticular.

O aumento da massa das glândulas adrenais é caracterizado pelo aumento do número de mitocôndrias e suas respectivas cristas mitocondriais, citocromos, retículo endoplasmático e polissomos, os quais são os principais sintetizadores de corticoides (VIRU, 1985). Apesar do aumento da massa das adrenais pelo treinamento, a concentração plasmática do cortisol não sofreu alteração corroborando com as evidências de que, em exercícios de baixa e moderada intensidade, a concentração de cortisol se altera pouco (PEDERSEN; HOFFMAN-GOETZ, 2000). É possível, também, que esses valores não tenham sido alterados devido a eutanásia dos animais ter ocorrido após 48 horas da última sessão de treinamento físico, ultrapassando, assim, o tempo de meia-vida plasmática de 80 minutos desse hormônio (CASTRO; MOREIRA, 2002).

O treinamento físico progressivo de intensidade moderada, isoladamente, diminuiu a massa corporal com a redução do TASC e visceral total, sem alteração do consumo alimentar (dados não mostrados). Resultados semelhantes de treinamentos com exercício físico (HASHIMOTO; SATO; IEMITSU, 2013) foram associados ao aumento da demanda energética (MORO et al., 2014) durante ou após a atividade física, sem alterações da ingestão calórica por compensação (ZHAO et al., 2011).

A redução da massa do TAV e TASC com o treinamento físico isolado foi acompanhada por um menor volume e elipticidade dos adipócitos do TASC, semelhante ao observado por De Matteis e colaboradores (2013). Entretanto, não houve alterações do número de adipócitos no TASC e nos três tipos de tecidos

adiposos viscerais analisados. Assim, o efeito do treinamento físico de intensidade moderada sobre o tecido adiposo, neste estudo, pode estar relacionado com a diminuição da sua atividade lipogênica e aumento da lipólise (HOROWITZ; KLEIN, 2000; HOROWITZ, 2003; MORO et al., 2014).

Nos tecidos adiposos abdominais, o treinamento físico aumentou a expressão gênica dos receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos (TAME, TAR e TASC) e das enzimas lipolíticas HSL (TAE e TASC) e ATGL (TASC). Segundo Stallknecht et al. (2001), o maior estímulo para a ativação da lipólise durante o exercício é o aumento da secreção de catecolaminas, com subsequente estimulação  $\beta$ -adrenérgica, fosforilação e ativação da HSL. A expressão gênica da enzima HSL foi negativamente associada com a massa do TASC. Aumentos na expressão proteica e atividade da HSL no tecido adiposo ocorrem com o treinamento físico de *endurance* (DONSMARK et al., 2004; HASHIMOTO; SATO; IEMITSU, 2013; OGASAWARA et al., 2015), sendo esta a lipase de maior ação na lipólise estimulada por catecolaminas (FERNANDEZ et al., 2008). Entretanto, a ATGL também possui ação na lipólise de triglicerídeos e junto com a HSL é responsável por 95% da lipólise de triglicerídeos (SCHWEIGER et al., 2006).

O treinamento físico isolado aumentou a expressão gênica da PKA em todos os tecidos adiposos analisados. O aumento da atividade lipolítica do tecido adiposo pelo treinamento físico é dependente do aumento da capacidade oxidativa mitocondrial para o fornecimento da energia necessária para a formação de AMPc e, posterior ativação da PKA e fosforilação da HSL (FLACHS et al., 2013). A redução da massa e o aumento da expressão gênica da HSL no TASC entre os animais treinados fisicamente foi correlacionada, respectivamente, de forma negativa e positiva com o aumento dos níveis plasmáticos de testosterona total. Há evidências que o treinamento físico com sessões de curta duração aumenta os níveis plasmáticos de testosterona (VIRU et al., 1998). Este hormônio reduz o ganho de massa corporal por aumentar a atividade da HSL no tecido adiposo (XU et al., 1993) e diminuir a atividade da LPL (GRAY et al., 1979), cuja expressão gênica foi menor no TAME e TASC nos animais que foram submetidos ao treinamento físico em nosso estudo, semelhante ao descrito por TESSIER et al. (2010).

Além de atuar sobre o metabolismo do tecido adiposo, a testosterona está associada com o aumento da massa muscular (HOYOS et al., 2012), que apesar de



não ter sido avaliada nos nossos animais, pode ter sido maior entre os ratos treinados em comparação com os sedentários e conseqüentemente, influenciado na massa corporal final, de forma que os seus valores não fossem ainda menores.

Apesar dos indicativos de aumento da mobilização lipídica (pelos marcadores lipolíticos) nos tecidos adiposos analisados, a concentração dos ácidos graxos livres não foi alterada com o treinamento físico nos ratos analisados. O treinamento físico de *endurance* determina melhora na coordenação entre a mobilização, captação e oxidação de ácidos graxos, evitando assim, prejuízos na captação de glicose e alterações da sinalização insulínica (HOROWITZ, 2003). As evidências de correlação entre a testosterona e a expressão gênica de marcadores de fosforilação oxidativa (PITTELOUD et al., 2005), permite-nos inferir a possibilidade de o aumento da testosterona entre os ratos treinados ser um dos mecanismos que pode ter influenciado o possível aumento da oxidação de AGL nos músculos esqueléticos e favorecido a redução dos depósitos adiposos analisados.

Em ratos saudáveis e eutróficos, a manutenção da concentração plasmática de insulina, assim como dos índices de avaliação da sensibilidade (QUICKI e QUICKI-R) e resistência à insulina (HOMA-IR) confirmam que o treinamento físico de *endurance* mantém os mecanismos de regulação da glicose e da homeostase da insulina. Em indivíduos com sobrepeso, o treinamento físico de *endurance* promove melhora do perfil lipídico plasmático ao diminuir a concentração de triglicerídeos e LDL-c e aumentar a concentração de HDL-c, com possíveis benefícios cardiovasculares (KRAUS et al., 2002). Entretanto, nossos resultados com ratos machos saudáveis não apontaram quaisquer alterações no perfil lipídico após o treinamento físico. Os efeitos do treinamento físico sobre o perfil lipídico podem ser mediados pela redução na massa de gordura visceral, mas também pela indução de um ambiente anti-inflamatório em cada sessão de exercício (PETERSEN; PEDERSEN, 2005; MATHUR; PEDERSEN, 2008).

A realização de treinamento físico progressivo de intensidade moderada determinou a diminuição da expressão gênica de IL-6 no TAE e de TNF- $\alpha$  no TAE, TAME e TASC. Esses dados são semelhantes às evidências de que a prática regular de exercício diminui os níveis de adipocinas inflamatórias, tais como a IL-6, TNF- $\alpha$  (OUNIS et al., 2009; MUJUMDAR et al., 2011; EL-KADER; GARI; SALAH EL-DEN, 2014). Estas citocinas inflamatórias são envolvidas na inflamação, apoptose,

citotoxicidade e induz a resistência insulínica (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). Ademais, existe uma correlação inversa entre o TNF- $\alpha$  e o metabolismo da glicose, já que o TNF- $\alpha$  suprime a sinalização insulínica, reduz a fosforilação do IRS-1 e da PI3K e a subsequente síntese e translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática (ARNER, 1995).

A redução da expressão gênica de IL-6 e TNF- $\alpha$  pelo treinamento físico ocorreu em associação com a diminuição da massa dos depósitos adiposos analisados, assim como o observado por Mujumdar e colaboradores (2011). Possivelmente, a redução da expressão gênica de IL-6 ocorreu por um efeito parácrino do TNF- $\alpha$  (GRUNFELD; FEINGOLD, 1991). Existem evidências de que o treinamento físico inibe a infiltração de monócitos e macrófagos no tecido adiposo de camundongos obesos (KAWANISHI et al., 2010), não sendo este efeito observado em ratos eutróficos.

Os nossos resultados também mostraram que o treinamento físico de *endurance* reduziu o volume, a elipiticidade, a área lipídica e aumentou a coloração granular eosinofílica dos adipócitos do TAMAR. A diminuição da massa (SEGAWA et al., 1998), do tamanho das gotículas de lipídios (DE MATTEIS et al., 2013; SLOCUM et al., 2013) e da área dos adipócitos no TAMAR já foi relatada após a realização de treinamento físico de intensidade moderada (DE MATTEIS et al., 2013) e pode ser relacionada com a ativação desse tecido por meio do aumento da expressão de genes relacionados a função e biogênese mitocondrial (SLOCUM et al., 2013).

O aumento de atividade simpática no TAMAR após o treinamento físico de intensidade moderada, por meio da fosforilação da PKA, fosforila a p38 MAPK que ativa a PGC-1 $\alpha$  (HARMS; SEALE, 2013), a qual é responsável pela regulação da biogênese mitocondrial, expressão de proteínas mitocondriais, ativação dos receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos, da AMPK (SLOCUM et al., 2013), enzimas desacopladoras da mitocôndria do tipo 1 (UCP1) e outros componentes termogênicos no tecido adiposo (HASHIMOTO; SATO; IEMITSU, 2013). Esses fatores são relacionados com o aumento do gasto energético e subsequente, perda de massa corporal em humanos (SAITO et al., 2009). Além disso, apesar da presença de *browning* nos tecidos adiposos branco analisados não ter sido avaliada, é possível que essa transformação tenha ocorrido. Wu e colaboradores (2014)

apontaram que o treinamento físico de *endurance* progressivo determinou o aumento da proteína contendo o domínio 5 da fibronectina (FNDC5) no tecido adiposo subcutâneo de forma a aumentar o gasto energético por termogênese em ratos.

Da mesma forma que o treinamento físico isolado, a terapia ultrassônica reduziu a massa corporal, do TASC e do TAV. A redução de massa corporal (MIWA et al., 2002), de tecido adiposo subcutâneo em ratos saudáveis (GONÇALVES et al., 2009a) e humanos eutróficos (PALUMBO et al., 2011; MILANESE et al., 2014; NASSAR et al., 2015) ou mesmo do TAR (GONÇALVES et al., 2009a) com a terapia ultrassônica já foi descrita, porém não encontramos relatos de alterações na massa do TAV e TAME em roedores ou em humanos. Partindo do pressuposto que a gordura visceral mesentérica nos ratos analisados estava a uma profundidade inferior a estimativa de profundidade de meio valor para o tecido adiposo (17mm) com a aplicação de ultrassom de 3MHz (DOWSETT et al., 2006), é possível que as ondas sonoras tenham sido absorvidas parcialmente por estes tecidos e promovido a diminuição da massa dos mesmos.

Apesar da terapia ultrassônica ter determinado a redução das massas corporal e dos tecidos adiposos descritos, reduções do trofismo foram apresentadas apenas em relação ao volume e a elipticidade dos adipócitos do TASC. Bani et al. (2013) verificaram que a terapia ultrassônica não focada, pulsada, frequência de 20KHz, com potência de 3W/cm<sup>2</sup> sobre o TASC de mulheres reduziu as medidas das dobras cutâneas nas regiões do abdome e o tamanho dos vacúolos lipídicos dos respectivos adipócitos. Da mesma forma, esses autores verificaram *in vitro* a redução dos vacúolos de lipídios nos adipócitos tratados com o ultrassom.

Como não houve alteração nas medidas de estimativa de consumo alimentar (dados não mostrados), não é possível creditarmos uma possível diminuição da ingestão alimentar como motivo para as reduções de medidas de massas corporal, de tecido adiposo e volume dos adipócitos descritas anteriormente. Entretanto, existem evidências de que a terapia ultrassônica determina efeitos lipolíticos por meio da secreção de norepinefrina nas terminações nervosas simpáticas na região do corpo irradiada (MIWA et al., 2002).

Ao analisar os efeitos da terapia ultrassônica sobre a expressão gênica de marcadores lipolíticos, observou-se que o ultrassom não determinou alterações na

expressão de receptores  $\beta_3$  adrenérgicos, PKA e HSL em nenhum depósito adiposo abdominal sendo que apenas a expressão gênica de ATGL aumentou no TAME. Quanto ao perfil antilipogênico observou-se a redução dos níveis de RNAm da LPL apenas no TAR. Esses resultados limitados de diminuição da lipogênese (redução da LPL no TAR) e aumento da lipólise (elevação da ATGL no TAME) podem até ter contribuído para a diminuição da massa do TAV, mas possivelmente, não foram suficientes ou determinantes para a redução desse tecido. Assim, não é possível inferir que o efeito liporedutor da terapia ultrassônica de alta potência empregada em nosso estudo seja decorrente da ativação das vias lipolíticas adrenérgicas.

Apesar de não haver evidências sobre alterações na expressão gênica dos marcadores lipolíticos e lipogênicos após realização da terapia ultrassônica não focada de alta intensidade, o potencial do ultrassom focado pulsado e de alta intensidade em determinar alterações da expressão gênica, particularmente, de marcadores inflamatórios ou relacionados com o ciclo celular de células tumorais de camundongos já foi anteriormente demonstrado (HUNDT et al., 2013).

Considerando os efeitos antilipolíticos da insulina em decorrência da ativação da PKB e posterior desativação da PKA (GATHERCOLE et al., 2013), o aumento dos níveis plasmáticos de insulina entre os animais submetidos apenas à terapia ultrassônica pode ter inibido a ação da HSL no TASC por ser esse tecido mais sensível à insulina do que os tecidos adiposos viscerais. Também há relatos de ação inibitória da insulina sobre a expressão gênica da ATGL (KERSHAW et al., 2006; KIM et al., 2006) sendo sugerido para tal, um mecanismo dependente da diminuição de PPAR $\gamma$  (KIM et al., 2006).

A lipólise no tecido adiposo subcutâneo contribui, principalmente, para o fluxo sistêmico de ácidos graxos (HOROWITZ, 2003), mas o aumento da insulina pode ter influenciado na manutenção dos níveis plasmáticos de ácidos graxos após o emprego da terapia ultrassônica em ratos aptos fisicamente. Esse resultado foi diferente do que ocorreu em nosso estudo piloto realizado com animais inaptos, em que o uso do ultrassom também com potência de 3W/cm<sup>2</sup> aumentou a concentração de ácidos graxos livres.

A manutenção da massa, volume, elipticidade e área lipídica do tecido adiposo marrom impede que os resultados dos ácidos graxos livres sejam associados com a

influência desse tecido em um possível mecanismo de termogênese após a terapia ultrassônica isolada. Um possível aumento local na expressão gênica de UCP2 e UCP3 na musculatura esquelética após a terapia ultrassônica como descrito por Kogure et al. (2005) pode ter contribuído para os níveis inalterados de ácidos graxos livres encontrados em nosso estudo, já que eles podem ter sido oxidados por esse mecanismo.

A terapia ultrassônica isolada determinou a diminuição do número de adipócitos no TAE e TASC, efeito não observado após a realização do treinamento físico isolado nem descrito na literatura científica pesquisada, mas que pode ter contribuído para a redução da massa corporal total, do TASC e TAV entre os animais em que apenas a terapia ultrassônica foi aplicada. Embora não avaliados em nosso estudo, os efeitos cavitacionais do ultrassom de alta potência (DUBINSKY et al., 2008; BROWN et al., 2009; BANI et al., 2013), assim como a influência de uma possível redução na expressão gênica de PPAR $\gamma$  subsequente a terapia ultrassônica (KIM; CHOI, 2011) podem ser citados como as possíveis causas da redução do número de adipócitos.

O uso da terapia ultrassônica com a potência de 3W/cm<sup>2</sup> induz o desenvolvimento de bolhas de gás micrométricas nos tecidos (FRENKEL; KIMMEL; IGER, 2000; NYBORG, 2001) durante os picos positivos e negativos da onda sonora, características típicas de um processo cavitacional (KHOKHLOVA et al., 2006). Na sequência, as altas pressões na região externa e altas temperaturas internamente nas bolhas, forçam o colapso das mesmas (DUBINSKY et al., 2008) e podem provocar alteração histológica com liberação de gordura ou mesmo apoptose como consequência desse processo mecânico (PALUMBO et al., 2011). Em estimulação ultrassônica com potência semelhante, Brown e colaboradores (2009) observaram a formação de cavitações no tecido adiposo de suínos e destruição mecânica de adipócitos com preservação do tecido conjuntivo. Em cortes histológicos de adipócitos humanos submetidos à terapia ultrassônica com frequências e potências semelhantes, foram observadas rupturas dos adipócitos e retração das fibras colágenas (FERRARO et al., 2008).

Além de fatores de crescimento e químicos, a estimulação mecânica por alongamento, contração muscular ou mesmo a terapia ultrassônica pode influenciar a proliferação e diferenciação de vários tipos de células (LUU, 2009; HUANG et al.,

2010), porém os mecanismos de sinalização celular desse tipo de estimulação sobre as células tronco permanecem desconhecidos. Kim e Choi (2011) observaram que a estimulação ultrassônica de 1MHz, potência de 100 mW/cm<sup>2</sup> tem efeitos inibitórios sobre a diferenciação dos adipócitos associado com a redução da expressão gênica de PPAR $\gamma$ . Da mesma forma, Kusuyama e colaboradores (2014) verificaram que a aplicação do ultrassom de 1,5MHz a 30 mW/cm<sup>2</sup> suprimiu a diferenciação adipogênica, diminuiu a expressão gênica do PPAR $\gamma$ 2 e proteína do tipo 4 ligadora de ácidos graxos (FABP4). Apesar de não terem sido encontrados trabalhos sobre a influência da terapia ultrassônica de alta potência sobre os níveis de RNAm de PPAR $\gamma$ , é possível que a expressão gênica desse receptor nuclear e a de C/EBP tenha diminuído e influenciado na redução do número de adipócitos do TAE e TASC (DE QUEIROZ et al., 2009).

A redução da massa, volume e elipticidade dos adipócitos do TASC após a realização isolada da terapia ultrassônica ou do treinamento físico foi associada com a redução dos níveis plasmáticos de leptina. A leptina é uma adipocina associada com o consumo alimentar (KAIYALA et al., 2015) e com o volume do tecido adiposo, especialmente, o subcutâneo (BRADLEY; CLEVELAND; CHEATHAM, 2000). A expressão gênica de leptina neste tecido está positivamente relacionada com a concentração sérica desse hormônio (MANTZOROS; FLIER; ROGOL, 1997) e negativamente com o aumento da atividade dos receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos, como ocorre no exercício físico (COILLARDE et al., 2002). A redução da leptina plasmática também foi associada com a diminuição da expressão gênica de TNF- $\alpha$  entre os animais apenas treinados fisicamente. Evidências apontam que o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão gênica e os níveis plasmáticos da leptina por meio do receptor p55 de TNF- $\alpha$  (FINCK; JOHNSON, 2000).

A associação do treinamento físico com a terapia ultrassônica reduziu a massa do TAE de forma associada com a diminuição do número de adipócitos em comparação com a realização do treinamento físico isolado. Contudo, a interação entre os tratamentos não foi suficiente para alterar o volume dos adipócitos, apesar da maior expressão gênica de receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos no TAE. Da mesma forma, o efeito aditivo da interação entre as terapias sobre a redução do número de adipócitos do TAE comparado aos grupos NS e NU e a expressão gênica dos

receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos em relação ao grupo NS não determinaram a diminuição da massa nesse tecido em relação a esses dois grupos experimentais.

Apesar da interação entre as terapias utilizadas ter acarretado, no TAME, a redução do volume dos adipócitos em relação ao grupo NS e NU, da elipticidade comparado ao grupo NS e do número dos adipócitos comparados aos outros grupos experimentais, a massa desse tecido não foi alterada. Assim como no TAME, a massa do TASC e TAR não foi influenciada pela interação do treinamento físico e terapia ultrassônica, sendo que neste último tecido, apenas o volume foi menor do que o grupo NS. O único estudo encontrado, até a data atual, sobre os efeitos da combinação dessas duas técnicas sobre o tecido adiposo, apontou a diminuição da espessura do tecido adiposo subcutâneo na região interna da coxa de homens sob efeitos agudos do exercício físico, e ainda assim, os efeitos na região abdominal não foram avaliados (MIWA et al., 2002).

O aumento da expressão gênica da HSL no TAME com a interação entre as terapias, comparado aos grupos NU e TS pode ter influenciado na redução do volume dos adipócitos desse tecido. Em contrapartida, as terapias associadas aumentaram os níveis de RNAm desse marcador lipolítico no TASC comparado ao grupo TS não implicando em alterações do volume ou massa desse tecido. No TAME e TAR A associação do ultrassom com o treinamento físico determinou efeitos contrários na expressão gênica da ATGL, respectivamente, de redução e aumento em relação à terapia ultrassônica isolada, porém esta não é a principal via de hidrólise de triglicérides em roedores (SCHWEIGER et al., 2006). Ao contrário dos marcadores lipolíticos, a interação entre os tratamentos não alterou a expressão gênica da LPL, sendo que a inexistência de estudos, até a presente data, sobre a expressão gênica dos marcadores lipolíticos e lipogênicos após a associação do treinamento físico com a terapia ultrassônica, impossibilita que comparações sejam realizadas.

A redução do número de adipócitos, que é um fator associado à deposição de gordura ectópica (GHOSH, 2014), não determinou o surgimento de micro e macrovesículas no tecido hepático entre os animais analisados, semelhante ao observado por Moreno-Moraga e colaboradores (2007) em ratos submetidos a apenas a terapia ultrassônica. A realização do estudo com ratos adultos submetidos à dieta normocalórica (DANTAS, 2011) também podem ter auxiliado a não

deposição ectópica no fígado, apesar do aumento da massa do referido órgão no grupo de animais submetidos ao treinamento físico associado à terapia ultrassônica comparado aos animais do grupo controle.

Os animais submetidos a associação dos dois procedimentos experimentais apresentaram elevação da concentração plasmática do cortisol em comparação o grupo NS porém sem alteração da massa das glândulas adrenais. O cortisol, como descrito anteriormente, pode ser sintetizado em situações de aumento de estímulos sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (COUTINHO et al., 2006). Sendo assim, o aumento do cortisol nesses ratos pode ter decorrido da síntese nos adipócitos dos tecidos adiposos viscerais por meio da enzima 11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo I ( $11\beta$ -HSD1), responsável por gerar cortisol ativo a partir de cortisona (COUTINHO et al., 2006).

Os níveis plasmáticos elevados de cortisol no grupo TU podem ter influenciado a redução da testosterona total sérica, que foram associados negativamente. O cortisol pode inibir o processo estereidogênico testicular induzido pelo LH ou reduzir a produção de AMPc nos testículos (LU et al., 1997). Nossos resultados apontaram uma associação negativa da testosterona total com a insulina plasmática e com a expressão de TNF- $\alpha$  no TAME, e positiva da expressão gênica de TNF- $\alpha$  no TAE e TASC com a insulina sérica. Evidências sugerem que a diminuição da testosterona pelo TNF- $\alpha$  decorra de sua ação inibitória sobre a atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (JONES, 2010) e que os níveis plasmáticos elevados de TNF- $\alpha$  (VIGNOZZI et al., 2012), insulina (PINTANA; CHATTIPAKORN; CHATTIPAKORN, 2015) e de resistência à insulina são relacionados, negativamente, com a concentração plasmática de testosterona (PITTELOUD et al., 2005).

Neste sentido, os teores elevados de testosterona total plasmática, nos animais apenas treinados, podem estar relacionados com a diminuição da massa e da expressão de TNF- $\alpha$  nos tecidos adiposos abdominais e manutenção da sensibilidade à insulina. Da mesma forma, a redução da concentração plasmática de testosterona total no grupo TU pode estar relacionada com o efeito aditivo da interação do treinamento físico com a terapia ultrassônica que determinou o aumento da expressão gênica de TNF- $\alpha$  no TAME em comparação com os animais apenas treinados fisicamente.



Apesar de nossos resultados apontarem diferenças nos níveis plasmáticos de estradiol, a razão entre o estradiol e a testosterona aumentou entre os animais do grupo NU, os quais apresentaram maiores valores de HOMA-IR e insulina plasmática. Na resistência à insulina, há aumento da expressão da enzima aromatase (COHEN 2001), a qual converte a testosterona em estradiol e, portanto, reduz os níveis plasmáticos de testosterona (VIGUERAS-VILLASENOR et al. 2011). A diminuição da sensibilidade à insulina tem sido associada ao aumento da razão entre o estradiol e a testosterona (PITTELOUD et al., 2005; XIA et al., 2015).

As lesões celulares decorrentes dos efeitos cavitacionais (FERRARO et al., 2008; BROWN et al., 2009) e a subsequente produção de citocinas inflamatórias (SHALOM et al., 2013) pode ser um elo entre a realização isolada da terapia ultrassônica de alta potência e o desenvolvimento de resistência insulínica. Foram observadas associações positivas entre a insulina plasmática e a expressão gênica de IL-6 e entre a insulina plasmática e a expressão gênica de TNF- $\alpha$  no TAE e TASC, respectivamente, no grupo NU e TU, assim como entre a insulina plasmática e o número de macrófagos no TASC em todos os grupos experimentais. Não foram encontrados estudos relacionando os efeitos da terapia ultrassônica de alta potência sobre a expressão gênica de IL-6 e TNF- $\alpha$  em tecidos adiposos. Contudo, o uso de ultrassom de baixa potência, em cultura de tecido adiposo abdominal humano, determinou menor expressão gênica de TNF- $\alpha$  (PARK et al., 2010) e em úlceras varicosas, a redução da expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$  (ESCANDON et al., 2012; YAO et al., 2014).

Apesar da IL-6 e TNF- $\alpha$  também serem secretados pelos monócitos e macrófagos, a secreção dessas citocinas aumenta no TAB sob resistência à insulina (HAUNER, 2004). Os nossos resultados de terapia ultrassônica isolada, em que a resistência à insulina foi configurada por meio do aumento do HOMA-IR, apontaram o aumento dos níveis plasmáticos de IL-6, assim como da expressão gênica de IL-6 no TAME e TASC. A associação do aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 com a expressão gênica desta citocina no TAME e TASC entre os animais submetidos apenas à terapia ultrassônica corrobora com as evidências de que parte da IL-6 provém do TAB (KERSHAW; FLIER, 2004; STELZER et al., 2012). Em adição, observamos que o aumento da IL-6 plasmática também foi fortemente associado com a elevação da insulina plasmática nesse grupo de animais, semelhante a

correlação dessas duas variáveis descrita por Kershaw e Flier (2004) e Stelzer e colaboradores (2012).

Os membros das MAPK como a JNK, ERK e a p38MAPK, I $\kappa$ B quinase (ARKAN et al., 2005; VALLERIE et al., 2008) ou a PKC (HAASCH et al., 2006) podem ser ativados pelo acoplamento das citocinas produzidas pela cavitação induzida pelo ultrassom no tecido adiposo sob o seu campo acústico. A ativação dessas vias determina a resistência à ação da insulina, incluindo bases moleculares como a inibição da capacidade de sinalização da IRS-1 através da ativação de serinoquinases (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010) ou mesmo a translocação de fatores de transcrição nuclear, tais como o NF $\kappa$ B e C-Jun que se ligam a sequências específicas de genes promotores e estimulam a transcrição de genes de citocinas inflamatórias (SAMAAN, 2011).

O aumento da expressão de citocinas inflamatórias nos tecidos adiposos visceral e TASC ativa as células inflamatórias presentes no tecido adiposo, predominantemente linfócitos tipo T e macrófagos regulatórios M1 (HUBER et al., 2008) e induzem a transformação dos macrófagos regulatórios do tipo M2 (M2) em M1 (KRATZ et al., 2014). Além disso, o aumento de citocinas favorece que os pré-adipócitos originem macrófagos (KOSTELI et al., 2010) e os monócitos que migram para o tecido adiposo e são expostos a essas mesmas condições ambientais, diferenciem-se em macrófagos (LUMENG et al., 2007; LUMENG et al., 2008).

Nossos resultados apontaram uma relação direta entre a expressão gênica de TNF- $\alpha$  e o número de macrófagos no TAME em todos os grupos experimentais evidenciando uma associação entre o aumento de citocinas inflamatórias e o número de macrófagos. Entre os animais submetidos apenas a terapia ultrassônica, percebeu-se forte associação entre a expressão gênica de IL-6 e o número de macrófagos no TAME, o que nos permite inferir que a expressão gênica de citocinas pode ter atuado de forma parácrina propagando a inflamação no tecido adiposo como verificado por Bergman e Ader (2000) e Sell e Eckel (2009).

Com a terapia ultrassônica isolada, observou-se o aumento do número de macrófagos no TAME, mas esse tratamento não implicou na formação de estruturas do tipo *crown-like* em nenhum tecido adiposo ou no tecido hepático. Entretanto, a associação do ultrassom com o treinamento físico atenuou a elevação da contagem

de macrófagos no TAME, assim como diminuiu o número de estruturas *crown-like* no TASC. Possivelmente, a melhora da tolerância à glicose e a tendência de normalização do HOMA-IR neste grupo experimental em comparação com o grupo NU determinaram a melhora da inflamação nesses tecidos. A interação entre as terapias também determinou o aumento de estruturas *crown-like* no TAE em relação ao treinamento físico isolado, do número de macrófagos no TAME comparado aos grupos NS e TS, assim como no TAE em relação a terapia ultrassônica isolada e no TASC em relação a todos os outros grupos experimentais.

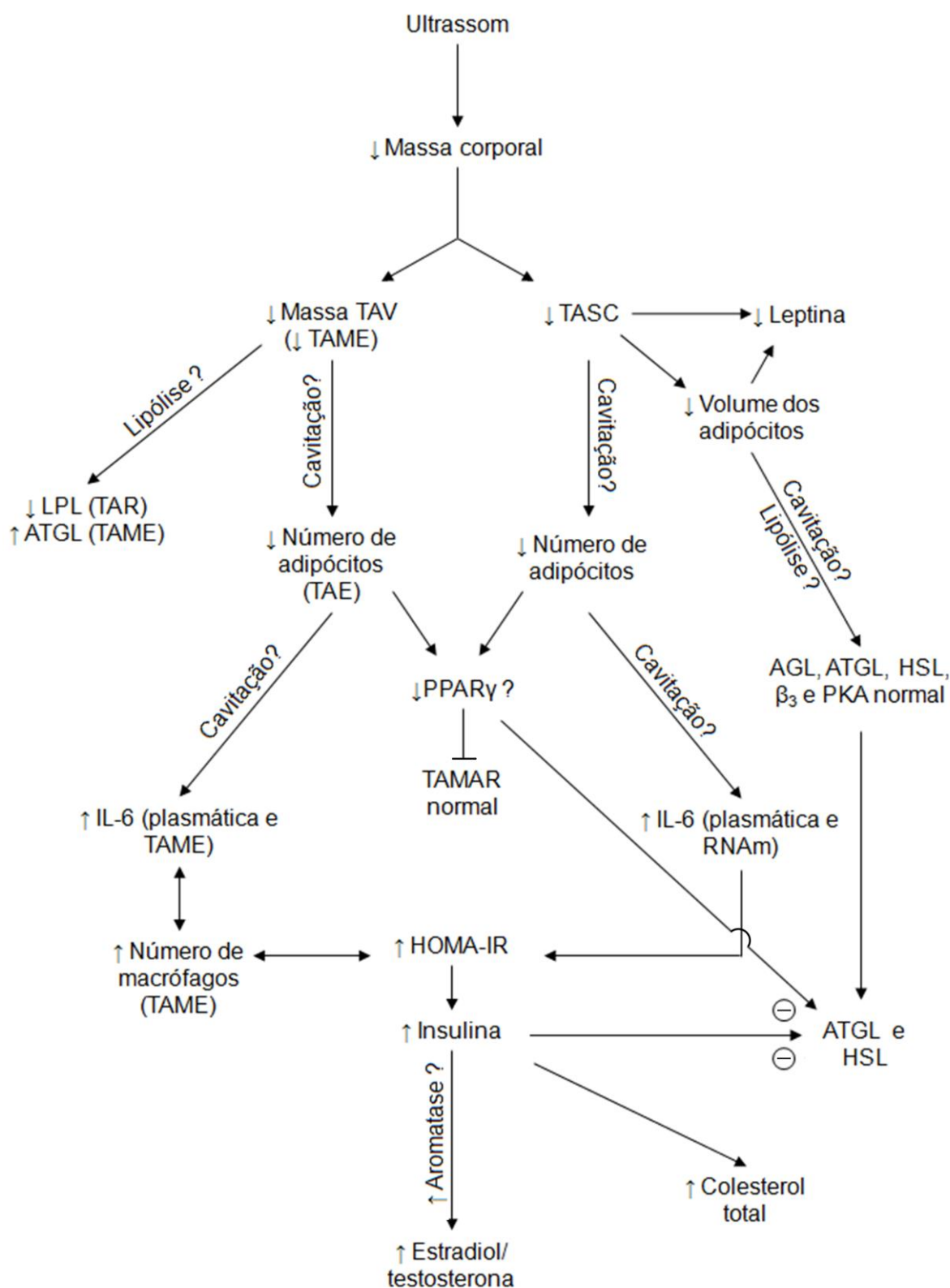
A necessidade de transporte de lipídios e debris celulares, subsequente à realização de terapia ultrassônica de alta potência pode ter ocasionado o aumento do número de macrófagos nos tecidos adiposos (JEWELL; DESILETS; SMOLLER, 2011; SHALOM et al., 2013), mesmo com a incipiente melhora da homeostase da insulina determinada pela interação entre as terapias comparado ao uso apenas do ultrassom. Considerando-se que o anticorpo utilizado na avaliação por imunohistoquímica foi o anti-ED1, não distingue o tipo de macrófago, não é possível afirmar qual o tipo de macrófago teve a sua prevalência aumentada neste tecido e assim, o aumento do número de macrófagos no TAE e TASC no grupo TU em relação ao grupo NU, pode ter sido de macrófagos do tipo M2.

Fatemi (2010) descreveu que a redução do volume local de tecido adiposo subcutâneo após uma única sessão de terapia ultrassônica focada de alta potência, em homens e mulheres, não implicou em alterações dos lipídios plasmáticos após 1 dia, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 semanas da sessão de ultrassom. Contudo, após três aplicações de terapia ultrassônica focada de alta potência em humanos, com intervalo de 30 dias, foi observado o aumento dos triglicerídeos plasmáticos dentro dos limites de referência (MORENO-MORAGA et al., 2007). Em nosso estudo, a terapia ultrassônica de alta potência não focada isolada determinou apenas o aumento do colesterol total em relação ao perfil lipídico, enquanto que a interação com o treinamento físico ocasionou o aumento do LDL-c comparado ao grupo NS, possivelmente, por a aplicação do ultrassom ter ocorrido por dez dias consecutivos.

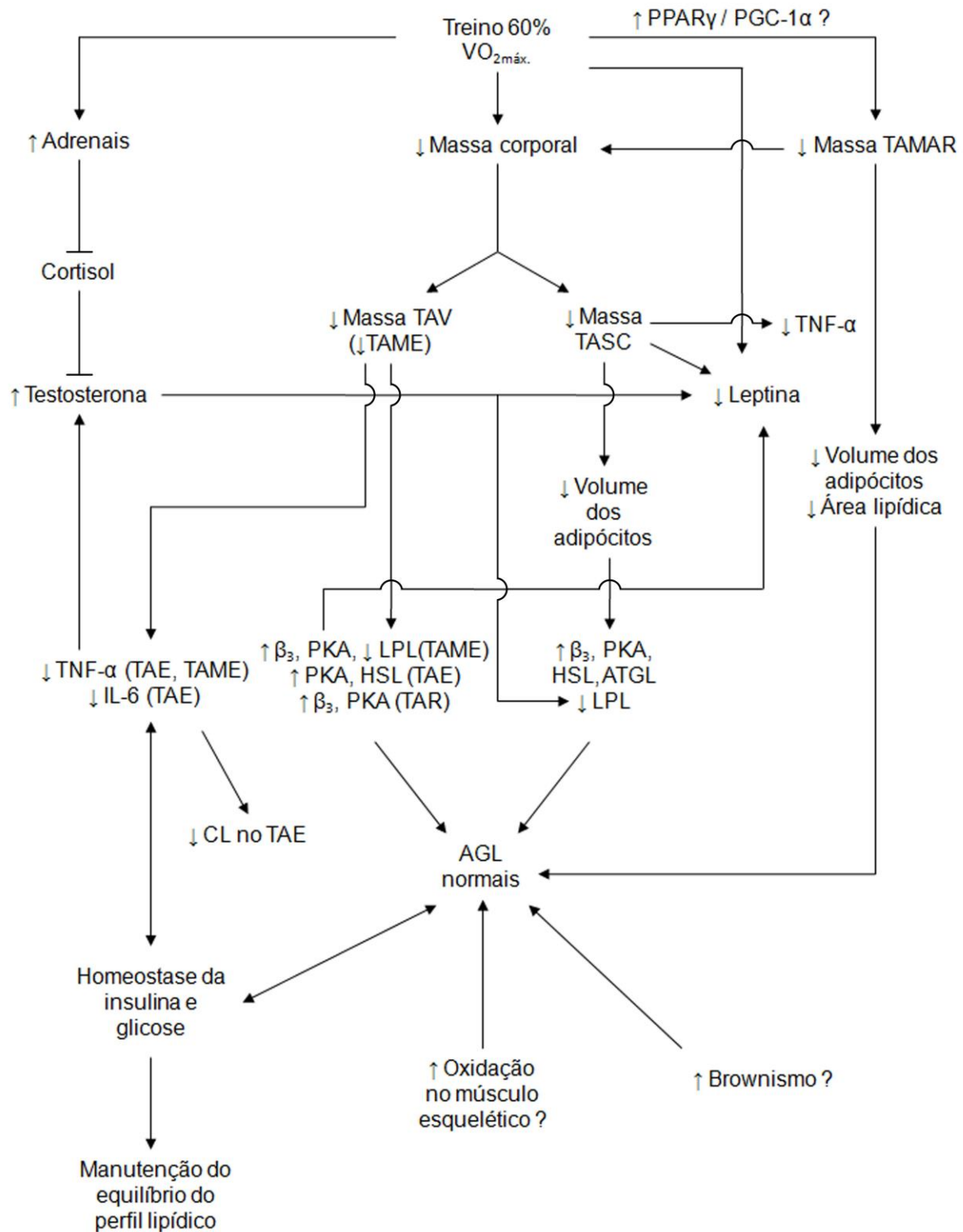
Apesar da terapia ultrassônica isolada ter determinado o aumento da IL-6 plasmática, que é a principal responsável pela síntese da proteína C reativa no fígado (MCLAUGHLIN et al., 2002), não houve alteração de proteína C reativa plasmática, ao contrário do verificado por Gonçalves et al. (2009b) ao utilizar a

terapia ultrassônica pulsada a 20% e potência de  $1\text{W}/\text{cm}^2$ . A manutenção dos níveis plasmáticos da proteína C reativa, provavelmente, se deve ao tempo decorrido de 48 horas entre a eutanásia dos animais e a realização da última sessão de terapia ultrassônica, já que esse é um marcador inflamatório de fase aguda e os seus níveis séricos aumentam em torno de 4 a 6 horas após uma lesão tecidual ou inflamação e declinam rapidamente com a resolução do processo inflamatório (BLAKE; RIDKER, 2001).

Diante do exposto, os efeitos do uso isolado da terapia ultrassônica de alta potência e do treinamento físico de intensidade moderada sobre os tecidos adiposos e hepático e o perfil bioquímico-hormonal foram compilados, respectivamente, nas Figuras 19 e 20.



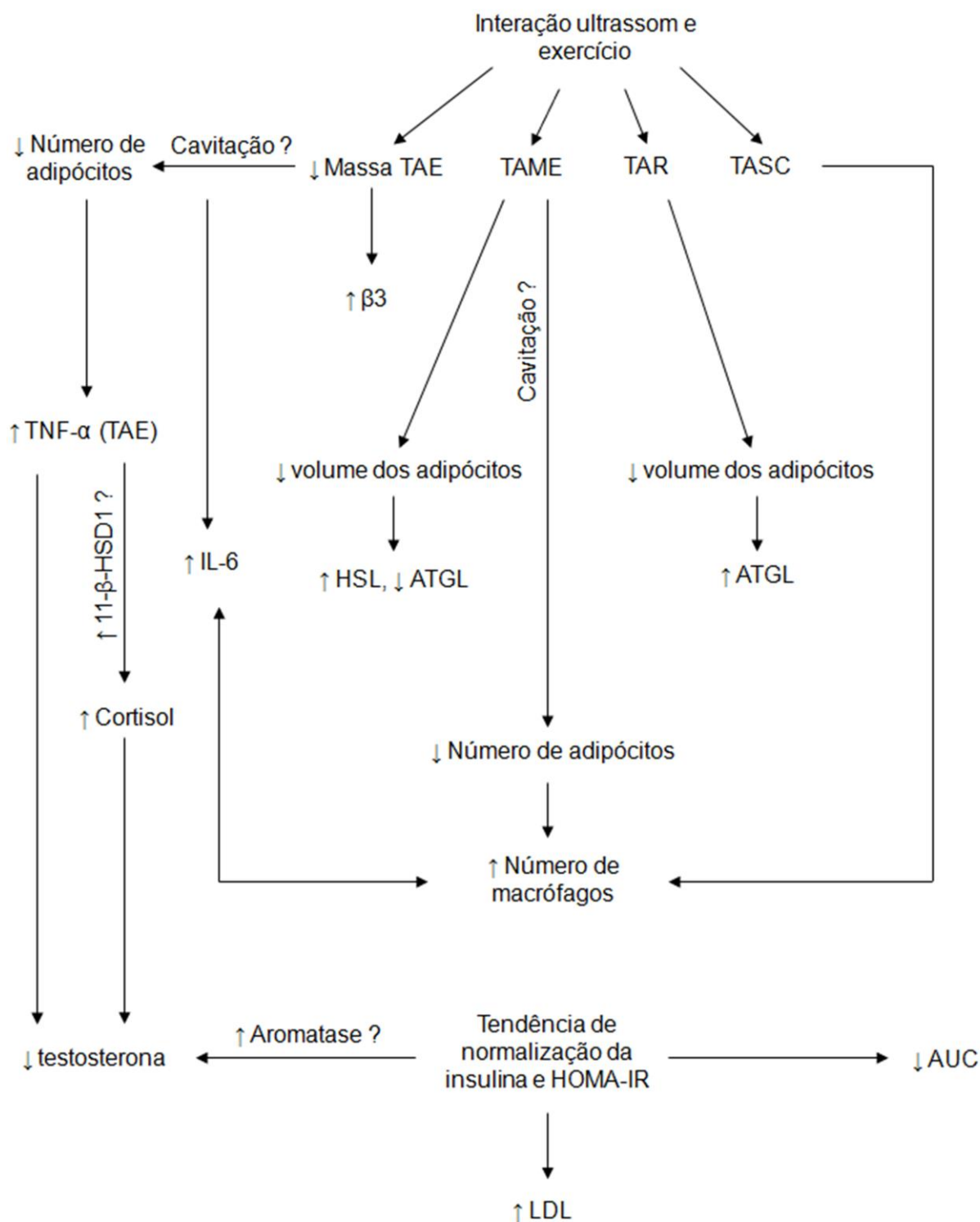
**Figura 19** - Esquema sobre os efeitos do uso isolado da terapia ultrassônica de alta potência sobre os tecidos adiposos e hepático e o perfil bioquímico-hormonal. ATGL= Lipase de triglicerídeos;  $\beta_3$ = Receptor  $\beta_3$  adrenérgico; HOMA-IR= Modelo de avaliação de homeostase da resistência à insulina; HSL= Lipase hormônio sensível; IL-6= Interleucina-6; LPL= Lipoproteína lipase; PPAR $\gamma$ = Receptor do tipo gama ativado por peroxissomo proliferador; TAE= Tecido adiposo epididimal; TAMAR= Tecido adiposo marrom; TAME= Tecido adiposo mesentérico; TAR= Tecido adiposo retroperitoneal; TASC= Tecido adiposo subcutâneo; TAV= Tecido adiposo visceral total.



**Figura 20** - Esquema sobre os efeitos do uso isolado do treinamento físico progressivo de moderada intensidade sobre os tecidos adiposos e hepático e o perfil bioquímico-hormonal. ATGL= Lipase de triglicerídeos;  $\beta_3$ = Receptor  $\beta_3$  adrenérgico; CL= Estruturas tipo *crowm-like*; HSL= Lipase hormônio sensível; IL-6= Interleucina-6; LPL= Lipoproteína lipase; PKA= Proteína quinase A; TAE= Tecido adiposo epididimal; TAMAR= Tecido adiposo marrom; TAME= Tecido adiposo mesentérico; TAR= Tecido adiposo retroperitoneal; TASC= Tecido adiposo subcutâneo; TAV= Tecido adiposo visceral total.

A associação do treinamento físico com a terapia ultrassônica não determinou melhora do perfil inflamatório, com manutenção dos níveis plasmáticos de IL-6, aumento da expressão gênica de IL-6 no TAE, TNF- $\alpha$  no TAME, do número de macrófagos no TAE, TAME e TASC. Ademais, a interação entre as terapias apenas diminuiu o número de macrófagos no TAME e de estruturas *crown-like* no TASC. Apesar da manutenção da inflamação com a associação de ultrassom e treinamento, a incipiente melhora na sensibilidade à insulina pode ter sido determinante para a melhora dos triglicerídeos e da tolerância a glicose. Essa inferência é possível baseada no fato de os níveis plasmáticos de triglicerídeos e insulina, HOMA-IR e AUC do teste de tolerância a glicose que foram maiores entre os animais apenas submetidos a terapia ultrassônica, terem sido reduzidos com a associação com o treinamento físico.

Os efeitos do uso associado da terapia ultrassônica de alta potência e do treinamento físico de intensidade moderada sobre os tecidos adiposos e hepático e o perfil bioquímico-hormonal encontram-se descritos de forma esquemática na Figura 21.



**Figura 21** - Esquema sobre os efeitos da interação da terapia ultrassônica de alta potência com o treinamento físico progressivo de moderada intensidade sobre os tecidos adiposos e hepático e o perfil bioquímico-hormonal. ATGL= Lipase de triglicérides; AUC= Área sob a curva do teste de tolerância à glicose;  $\beta_3$ = Receptor  $\beta_3$  adrenérgico; LDL= Lipoproteínas de baixa densidade; HOMA-IR= Modelo de avaliação de homeostase da resistência à insulina; HSL= Lipase hormônio sensível; IL-6= Interleucina-6; TAE= Tecido adiposo epididimal; TAME= Tecido adiposo mesentérico; TAR= Tecido adiposo retroperitoneal; TASC= Tecido adiposo subcutâneo; 11- $\beta$ -HSD1= 11-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1.



## 7 CONCLUSÃO

O treinamento físico e a terapia ultrassônica, isoladamente, reduzem a massa corporal, e dos tecidos adiposos viscerais e subcutâneos abdominais, sem alterar os teores de AGL. Contudo, enquanto o treinamento físico apresenta evidências termogênicas e de melhora do perfil inflamatório, a terapia ultrassônica aumenta o colesterol total, a inflamação sistêmica e dos depósitos adiposos abdominais e prejudica a homeostase da insulina. Sendo assim, considerando o perfil inflamatório e metabólico, o treinamento físico isolado apresenta vantagens em relação à terapia ultrassônica.

A aplicação da terapia ultrassônica em ratos treinados fisicamente em comparação com a aplicação em sedentários melhora a tolerância à glicose, reduz os triglicerídeos plasmáticos, aumenta a expressão de marcadores lipolíticos e inflamatórios, contudo não determina efeitos aditivos de redução da massa dos tecidos adiposos visceral e subcutâneo abdominais. A associação das terapias comparada ao treinamento físico isolado também não diminui a massa dos tecidos adiposos visceral e subcutâneo abdominais e ainda determina aumento de marcadores inflamatórios no tecido adiposo.

Assim, conclui-se que a associação dos tratamentos, em ratos *Wistar* eutróficos, em relação à terapia ultrassônica isolada, evita alterações da homeostase da glicose, mas não demonstra vantagens quando comparada a realização do treinamento físico isolado.

## REFERÊNCIAS

- ABDELHAMED, A. et al. Testosterone replacement alters the cell size in visceral fat but not in subcutaneous fat in hypogonadal aged male rats as a late-onset hypogonadal aged male rats as a late-onset hypogonadism animal model. **Research and Reports in Urology**, v. 7, p. 35-40, Mar. 2015.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 8, p. 327-332, Oct. 2000.
- AILHAUD, G.; HAUNER, H. Development of white adipose tissue. In: BRAY, A. G. B. **Handbook of Obesity: Etiology and Pathophysiology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 481-514.
- AL-BADER, M. D. Estrogen receptors alpha and beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real time PCR and Western blotting. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 4-13, Jan. 2006.
- ALTINTAS, M. M. et al. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 52, n. 3, p. 480-488, Dec. 2011.
- ARKAN, M. C. et al. IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 191-198, Feb. 2005.
- ARKINSTALL, M. J. et al. Regulation of fuel metabolism by preexercise muscle glycogen content and exercise intensity. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 6, p. 2275-2283, Dec. 2004.
- ARNER, P. Techniques for the measurement of white adipose tissue metabolism: a practical guide. **International Journal of Obesity and related metabolic disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 19, n. 7, p. 435-442, Jul. 1995.
- BANI, D. et al. Histological and Ultrastructural Effects of Ultrasound-induced Cavitation on Human Skin Adipose Tissue. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, v. 1, n. 6, p. e41, Sep. 2013.
- BANI, D.; CALOSI, L.; FAGGIOLI, L. Efeitos do tratamento de ultrassom de alta frequência sobre os tecidos da pele humana. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 6, n. 2, p. 138-146, Jul./Dec. 2014.
- BARBOZA, K. H. et al. Exercício físico promove tamponamento sobre o estresse: uma revisão. **RBPFEV-Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 5, n. 25, Jan./Fev. 2012.
- BATRA, A. et al. Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 6, p. 1931-1941, Jun. 2007.
- BERGMAN, R. N.; ADER, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 9, p. 351-356, Nov. 2000.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **The Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, Apr. 1968.

BLAKE, G. J.; RIDKER, P. M. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. **Circulation research**, v. 89, n. 9, p. 763-771, Oct. 2001.

BOULTON, T. G. et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. **Cell**, v. 65, n. 4, p. 663-675, May. 1991.

BOURGEOIS, F.; ALEXIU, A.; LEMONNTER, D. Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 17-26, Jan. 1983.

BRADLEY, R. L.; CLEVELAND, K. A.; CHEATHAM, B. The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 56, p. 329-358, 2000.

BRAMLETT, S. B. et al. Does  $\beta$ 3-adrenoreceptor blockade attenuate acute exercise-induced reductions in leptin mRNA? **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 5, p. 1678-1683, Nov. 1999.

BRITES, F. D. et al. Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels. **Atherosclerosis**, v. 152, n. 1, p. 181-192, Sep. 2000.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. B. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 45, n. 6, p. 1009-1015, Dec. 1978.

BROWN, S. A. et al. Characterization of non-thermal focused ultrasound for non-invasive selective fat cell disruption (lysis): Technical and pre-clinical assessment. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 124, n. 1, p. 92-101, Jul. 2009.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. A. N. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277-359, Jan. 2004.

CARNEIRO-JÚNIOR, M. A. et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 57, p. 119-128, Apr. 2013.

CASTRO, M.; MOREIRA, AC. Diagnóstico Laboratorial da Síndrome de Cushing. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.1, p. 97-105, Feb. 2002.

CHANG, S. L. et al. Combination therapy of focused ultrasound and radio-frequency for noninvasive body contouring in Asians with MRI photographic documentation. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 165-172, Jan. 2014.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 155-159, Apr. 1987.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 11, p. 2347-2355, Sep. 2005.

COELHO, F. D. **(IN)SATISFAÇÃO CORPORAL EM MULHERES SUBMETIDAS À CIRURGIA**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG: [s.n.]. 2013. p. 120f.

COHEN, P. G. Aromatase, adiposity, aging and disease. The hypogonadal-metabolic-atherogenic-disease and aging connection. **Medical Hypotheses**, v. 56, n. 6, p. 702-708, Jun. 2001.

COSTA, C. S. et al. Avaliação citométrica dos adipócitos localizados no tecido subcutâneo da parede anterior do abdome após infiltração percutânea de CO<sub>2</sub>. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 38, n. 1, p. 015-023, Jan./Fev. 2011.

COSTILL, D. L.; THOMASON, H. A. R. R. Y.; ROBERTS, E. R. I. C. Fractional utilization of the aerobic capacity during distance running. **Medicine and science in sports**, v. 5, n. 4, p. 248-252, 1973.

COUILLARD, C. et al. Plasma leptin response to an epinephrine infusion in lean and obese women. **Obesity Research**, v. 10, n. 1, p. 6-13, Jan. 2002.

COUTINHO, A. E. et al. Effect of voluntary exercise on peripheral tissue glucocorticoid receptor content and the expression and activity of 11 $\beta$ -HSD1 in the Syrian hamster. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 5, p. 1483-1488, May. 2006.

DALIA, R. A. et al. The influence of ultrasound and physical training on serum and muscle tryglicerides in experimental diabetic rats. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 2, Mar./Apr. 2011.

DANTAS, A. C. S. **Impacto da ovariectomia sobre alterações metabólicas e inflamatórias em modelos de obesidade induzida por dieta em ratas**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista, BA-BR: [s.n.]. 2011. p. 82f.

DE DEYNE, P. G.; KIRSCH-VOLDERS, M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblast. **Physical Therapy**, v. 75, n. 7, p. 629-634, Jul. 1995.

DE GLISEZINSKI, I. et al. Aerobic training improves exercise-induced lipolysis in SCAT and lipid utilization in overweight men. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 285, n. 5, p. E984-E990, Nov. 2003.

DE MATTEIS, R. et al. Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 6, p. 582-590, Jun. 2013.

DE QUEIROZ, J. C. F. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 582-594, Jul. 2009.

DE QUEIROZ, K. B. et al. Endurance training blocks uncoupling protein 1 up-regulation in brown adipose tissue while increasing uncoupling protein 3 in the muscle tissue of rats fed with a high-sugar diet. **Nutrition research**, v. 32, n. 9, p. 709-717, Sep. 2012.

- DE QUEIROZ, K. B. et al. Endurance training increases leptin expression in the retroperitoneal adipose tissue of rats fed with a high-sugar diet. **Lipids**, v. 49, n. 1, p. 85-96, Jan. 2014.
- DEBERT, G. G. A dissolução da vida adulta e a juventude como valor. **Horizontes antropológicos**, v. 16, n. 34, p. 49-70, Jul./Dec. 2010.
- DEL CORRAL, P. et al. Metabolic effects of low cortisol during exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 84, n. 3, p. 939-947, Mar. 1998.
- DESNOYERS F.; VODOVAR, N. Etude histologique comparée chez le porc et le rat du tissu adipeux périrenal au stade de son apparition. **Biology of the Cell**, v. 29, p. 177-182, 1977.
- DIJKSTRA, C. D. et al. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. **Immunology**, v. 54, n. 3, p. 589-599, Mar. 1985.
- DING, J.; SACKMANN-SALA, L.; KOPCHICK, J. J. Mouse models of growth hormone action and aging: a proteomic perspective. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 674-685, Feb. 2013.
- DIXON, J. B. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: improvement in liver histological analysis with weight loss. **Hepatology**, v. 39, n. 6, p. 1647-1654, Jun. 2004.
- DOAN, N. et al. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 57, n. 4, p. 409-419, Apr. 1999.
- DONSMARK, M. et al. Regulation and role of hormone-sensitive lipase in rat skeletal muscle. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 02, p. 309-314, May. 2004.
- DOWSETT, D.; KENNY, P. A.; JOHNSTON, R. E. **The Physics of Diagnostic Imaging**. Second. ed. New York: CRC Press, 2006.
- DRAPER, D. O.; CASTEL, J. C.; CASTEL, D. Rate of temperature increase in human muscle during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, v. 22, n. 4, p. 142-150, Oct. 1995.
- DRAPER, D. O.; SUNDERLAND, S. Examination of the law of grothus-draper: does ultrasound penetrate subcutaneous fat in humans? **Journal of Athletic Training**, v. 28, n. 3, p. 246, 1993.
- DRUMMOND, L. R. **Temperatura cerebral e ajustes termorregulatórios em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos ao exercício físico até a fadiga em ambiente quente**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG-BR: [s.n.]. 2014. p. 80f.
- DUBÉ, J. J. et al. Adipose triglyceride lipase deletion from adipocytes, but not skeletal myocytes, impairs acute exercise performance in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 10, p. E879-E890, May. 2015.
- DUBINSKY, T. J. et al. High-intensity focused ultrasound: current potential and oncologic applications. **American journal of Roentgenology**, v. 190, n. 1, p. 191-199, Jan. 2008.

ELGAZAR-CARMON, V. et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 9, p. 1894-1903, May. 2008.

EL-HAMED, M. Y. A.; EL-GENDY, M. H.; EL RAHMAN, E. M. A. Influence of ultrasound cavitation and electrolipolysis on obesity management. **Journal of American Science**, v. 10, n. 9, p. 188-196, 2014.

EL-KADER, S. A.; GARI, A. M.; EL-DEN, A. S. Impact of moderate versus mild aerobic exercise training on inflammatory cytokines in obese type 2 diabetic patients: a randomized clinical trial. **African Health Sciences**, v. 13, n. 4, p. 857-863, Dec. 2014.

ESCANDON, J. et al. A prospective pilot study of ultrasound therapy effectiveness in refractory venous leg ulcers. **International Wound Journal**, v. 9, n. 5, p. 570-578, Oct. 2012.

FANG, H. Y. et al. The effects of power on-off durations of pulsed ultrasound on the destruction of cancer cells. **International Journal of Hyperthermia**, v. 23, n. 4, p. 371-380, Jun. 2007.

FATEMI, A.; KANE, M. A. High-intensity focused ultrasound effectively reduces waist circumference by ablating adipose tissue from the abdomen and flanks: a retrospective case series. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 34, n. 5, p. 577-582, Oct. 2010.

FERNANDEZ, C. et al. Hormone-sensitive lipase is necessary for normal mobilization of lipids during submaximal exercise. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 1, p. E179-E186, Jul. 2008.

FERRARO, G. A. et al. Histologic effects of external ultrasound-assisted lipectomy on adipose tissue. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 32, n. 1, p. 111-115, Jan. 2008.

FERREIRA, F. et al. Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA $\alpha$  expression. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 63-67, Jan. 2004.

FINCK, B. N.; JOHNSON, R.W. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  induces leptin production through the p55 TNF receptor. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 2, p. R537-R543, Feb. 2000.

FLACHS, P. et al. Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: a key to lean phenotype. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 5, p. 986-1003, May. 2013.

FLYNN, M. G.; MCFARLIN, B. K. Toll-like receptor 4: link to the anti-inflammatory effects of exercise? **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 34, n. 4, p. 176-181, Oct. 2006.

FONSECA-ALANIZ, M. H. . et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. S192-S203, Nov. 2007.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FRENKEL, V.; KIMMEL, E.; IGER, Y. Ultrasound-induced intercellular space widening in fish epidermis. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 26, n. 3, p. 473-480, Mar. 2000.

FRIEDMANN, D. P. A. Review of the Aesthetic Treatment of Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue: Background, Implications, and Therapeutic Options. **Dermatologic Surgery**, v. 41, n. 1, p. 18-34, Jan. 2015.

GADD, V. L. et al. Portal, but not lobular, macrophages express matrix metalloproteinase-9: association with the ductular reaction and fibrosis in chronic hepatitis C. **Liver International**, v.33, n. 4, p. 569-579, Apr. 2013.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p.129-139, Mar. 2010.

GATHERCOLE, L. L. et al. Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26223, Oct. 2011.

GATHERCOLE, L. L.; MORGAN, S. A.; TOMLINSON, J. W. Hormonal regulation of lipogenesis. **Vitamins and Hormones**, v. 91, p. 1-27, Jan. 2013.

GHOSH, S. Ectopic fat: The potential target for obesity management. **Journal of Obesity and Metabolic Research**, v. 1, n. 1, p. 30-38, 2014.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 9, p. 607-615, Sep. 2011.

GOLDENBERG, M. **O corpo como capital: estudos sobre gênero, sexualidade e moda na cultura brasileira**. São Paulo: Estação das Letras e Cores, 2007.

GONÇALVES, W. L. S. et al. Implicações da lipoclasia dermossônica no metabolismo energético e na composição corporal de ratos Wistar saudáveis. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 13, n. 1, p. 24-30, Jan./Fev. 2009a.

GONÇALVES, W.L.S. et al. Ultrasound lipoclasia on subcutaneous adipose tissue to produce acute hyperglycemia and enhance acute inflammatory response in healthy female rats. **Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery** . v. 35, n. 11, p. 1741–1745, Nov. 2009b.

GOUTIANOS, G. et al. The rat adequately reflects human responses to exercise in blood biochemical profile: a comparative study. **Physiological Reports**, v. 3, n. 2, p. e12293, Feb. 2015.

GRAY, J. M. et al. Effects of testosterone on body weight and adipose tissue: Role of aromatization. **Physiology & Behavior**, v. 23, n. 3, p. 465-469, Sep. 1979.

GRAZER, F. M.; DE JONG, R. H.. Fatal outcomes from liposuction: census survey of cosmetic surgeons. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, n. 1, p. 436-446, Jan. 2000.

GREENBERG, A. S. et al. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 45456-45461, Nov. 2001.

GRUNFELD, C; FEINGOLD, K.R. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. **Biotherapy**, v. 3, n.2, p. 143–158, Apr. 1991

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367-377, May. 2008.

HAAR, G. T. Eletroterapia: Prática baseada em evidência. In: WATSON, T. **Princípios eletrofísicos e térmicos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

HAASCH, D. et al. PKC $\theta$  is a key player in the development of insulin resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 2, p. 361-368, May. 2006.

HADRI, K. et al. Down-regulation of  $\beta$ 3-adrenergic receptor expression in rat adipose tissue during the fasted/fed transition: evidence for a role of insulin. **Biochemical Journal**, v. 323, n. 2, Apr. 1997.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252-1263, Sep. 2013.

HASHIMOTO, T.; SATO, K.; IEMITSU, M. Exercise-inducible factors to activate lipolysis in adipocytes. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 2, p. 260-267, Jul. 2013.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiology & Behavior**, v. 83, n. 4, p. 653-658, Dec. 2004.

HENDERSON-KING, D.; HENDERSON-KING, E. Acceptance of cosmetic surgery: scale development and validation. **Body Image**, v. 2, n. 2, p. 137-149, Jun. 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, Sep. 2011.

HOROWITZ, J. F. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 14, n. 8, p. 386-392, Jan. 2003.

HOROWITZ, J. F. et al. Endurance exercise training does not alter lipolytic or adipose tissue blood flow sensitivity to epinephrine. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 277, n. 2, p. E325-E331, Aug. 1999.

HOROWITZ, J. F. et al. Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPAR $\alpha$  in the metabolic response to training. *American journal of physiology*. **Endocrinology and Metabolism**, v. 279, n. 2, p. E348–E355, Aug. 2000.

HOYOS, C. M. et al. Body compositional and cardiometabolic effects of testosterone therapy in obese men with severe obstructive sleep apnoea: a randomised placebo-controlled trial. **European Journal of Endocrinology**, v. 167, n. 4, p. 531-541, Oct. 2012.

HUANG, S. C. et al. Mechanical strain modulates age-related changes in the proliferation and differentiation of mouse adipose-derived stromal cells. **BMC Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 18, Mar. 2010.



HUBER, J. et al. CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3215-3221, Aug. 2008.

HUEY, P. U. et al. HUEY, Patricia Uelmen et al. Lipoprotein lipase is expressed in cultured Schwann cells and functions in lipid synthesis and utilization. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 11, p. 2135-2142, Nov. 1998.

HUNDT, W. et al. Gene expression profiles, histologic analysis, and imaging of squamous cell carcinoma model treated with focused ultrasound beams. **American Journal of Roentgenology**, v. 189, n. 3, p. 726-736, Sep. 2007.

International Society of Aesthetic Plastic Surgery. **ISAPS Global Statistics**, 2014. Disponível em: <<http://www.isaps.org/news/isaps-global-statistics>>. Acesso em: 05 Aug. 2015.

ISHIDA, K. et al. Obesity is necessary but not sufficient for the development of diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 45, n. 10, p. 1288-1295, Oct. 1996.

JAWORSKI, K. et al. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 293, n. 1, p. G1-G4, Jul. 2007.

JEWELL, M. L. et al. Safety and tolerability of high-intensity focused ultrasonography for noninvasive body sculpting: 24-week data from a randomized, sham-controlled study. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 32, n. 7, p. 868-876, Sep. 2012.

JEWELL, M. L.; DESILETS, C.; SMOLLER, B. R. Evaluation of a novel high-intensity focused ultrasound device: preclinical studies in a porcine model. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 31, n. 4, p. 429-434, May. 2011.

JONES, T. H. Effects of testosterone on Type 2 diabetes and components of the metabolic syndrome. **Journal of Diabetes**, v. 2, n. 3, p. 146-156, Sep. 2010.

KAKUMA, T. et al. Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 15, p. 8536-8541, Jul. 2000.

KALUPAHANA, N. S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, K. J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 1, p. 26-34, Feb. 2012.

KATZ, A. et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **The Journal Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 7, p. 2402-2410, Jul. 2000.

KAWANISHI, N. et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exercise Immunology Review**, v. 16, n. 16, p. 105-118, 2010.

KAWANISHI, N. et al. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 6, p. 931-941, Aug. 2012.

KEATING, S. E. et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 1, p. 174-182, Jul. 2015.

- KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, Jul. 2004.
- KERSHAW, E. E. et al. Adipose triglyceride lipase- function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. **Diabetes**, v.55, n. 1, p. 148–157, Jan. 2006.
- KHOKHLOVA, V. A. et al. Effects of nonlinear propagation, cavitation, and boiling in lesion formation by high intensity focused ultrasound in a gel phantom. **The Journal of the Acoustical Society of America**, v. 119, n. 3, p. 1834-1848, Mar. 2006.
- KIM, J. Y. et al. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF- $\alpha$  in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPAR $\gamma$ . **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 1, p. 115-127, Jul. 2006.
- KIM, K. H.; CHOI, B. H. Low-intensity ultrasound (LIUS) attenuates myogenic and adipogenic differentiations of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs). **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 8, n. 1, p. 87-95, Jan. 2011.
- KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 6, p. 1313-1321, Jun. 2005.
- KNUDSEN, E. C. et al. Increased levels of CRP and MCP-1 are associated with previously unknown abnormal glucose regulation in patients with acute STEMI: a cohort study. **Cardiovascular Diabetology**, v. 9, n. 1, p. 47, Sep. 2010.
- KOCH, L. G. et al. Test of the principle of initial value in rat genetic models of exercise capacity. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. R466-R472, Nov. 2005.
- KOCH, L. G.; BRITTON, S. L. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. **Physiological Genomics**, v. 5, n. 1, p. 45-52, Jan. 2001.
- KOGURE, A. et al. Effect of ultrasonic stimulation on mRNA abundance of uncoupling protein (UCP) 2 and UCP 3 in gastrocnemius muscle of rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, n. 1-2, p. 91-93, Jan. 2005.
- KOLA, B. et al. Changes in adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase as a mechanism of visceral obesity in Cushing's syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 12, p. 4969-4973, Jul. 2008.
- KOSTELI, A. et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 10, p. 3466, Oct. 2010.
- KRATZ, M. et al. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 614-625, Oct. 2014.
- KRAUS, W. E. et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 19, p. 1483-1492, Nov. 2002.
- KRAUSE, M. et al. The effects of aerobic exercise training at two different intensities in obesity and type 2 diabetes: implications for oxidative stress, low-grade inflammation and nitric oxide production. **European Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 2, p. 251-260, Feb. 2014.

- KRISTENSEN, K. et al. Systemic administration of epidermal growth factor reduces fat mass in rats: effects on the hormone-sensitive-lipase, lipoprotein lipase and leptin. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 50, n. 5, p. 292–296, 1998.
- KRSKOVA, K. et al. Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme mRNA decrease and AT1 receptor mRNA and protein increase in epididymal fat tissue accompany age-induced elevation of adiposity and reductions in expression of GLUT4 and peroxisome proliferator-activated receptor PPAR $\gamma$ . **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 403-410, Aug. 2011.
- KUSUYAMA, J. et al. Low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) influences the multilineage differentiation of mesenchymal stem and progenitor cell lines through ROCK-Cot/Tp12-MEK-ERK signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 15, p. 10330-10344, Apr. 2014.
- LAFONTAN, M. et al. An Unsuspected Metabolic Role for Atrial Natriuretic Peptides The Control of Lipolysis, Lipid Mobilization, and Systemic Nonesterified Fatty Acids Levels in Humans. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 10, p. 2032-2042, Oct. 2005.
- LANA, A. D. C.; PAULINO, C. A.; GONÇALVES, I. D. Influence of low and high intensity physical exercise on hypernociception threshold and other parameters of rats. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 5, p. 248-254, Sep./Oct. 2006.
- LANGIN, D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v. 53, n. 6, p. 482-491, Jun. 2006.
- LEE, D. H. et al. The effects of thiazolidinedione treatment on the regulations of aquaglyceroporins and glycerol kinase in OLETF rats. **Metabolism**, v. 54, n. 10, p. 1282-1289, Oct. 2005.
- LIMA, N. R.; COIMBRA, C. C.; MARUBAYASHI, U. Effect of intracerebroventricular injection of atropine on metabolic responses during exercise in untrained rats. **Physiology & Behavior**, v. 64, n. 1, p. 69-74, Apr. 1998.
- LIU, N. et al. Expression of IL-10 and TNF-alpha in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 6, n. 3, p. 207-213, Jun. 2009.
- LIU, W. X. et al. Voluntary exercise prevents colonic inflammation in high-fat diet-induced obese mice by up-regulating PPAR- $\gamma$  activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 459, n. 3, p. 475-480, Apr. 2015.
- LU, S. S. et al. Lactate and the effects of exercise on testosterone secretion: evidence for the involvement of a cAMP-mediated mechanism. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 29, n. 8, p. 1048-1054, Aug. 1997.
- LUMENG, C. N. et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 16-23, Jan. 2007.
- LUMENG, C. N. et al. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3239-3246, Dec. 2008.

- LUMENG, C. N.; MAILLARD, IVAN; SALTIEL, ALAN R. T-ing up inflammation in fat. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 846-847, Aug. 2009.
- LUU, Y. K. et al. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 1, p. 50-61, Jan. 2009.
- MA, Z. et al. Radioimmunoassay of leptin in human plasma. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 942-946, Jun. 1996.
- MAFFEI, M. et al. The obesity and inflammatory marker haptoglobin attracts monocytes via interaction with chemokine (CC motif) receptor 2 (CCR2). **BMC Biology**, v. 7, n. 1, p. 87, Dec. 2009.
- MANTZOROS, C. S.; FLIER, J. S.; ROGOL, A. D. A Longitudinal Assessment of Hormonal and Physical Alterations during Normal Puberty in Boys. V. Rising Leptin Levels May Signal the Onset of Puberty. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 4, p. 1066-1070, Apr. 1997.
- MARTIN, W. D. et al. Effect of endurance training on plasma free fatty acid turnover and oxidation during exercise. **American Journal of Physiology-Endocrin**, v. 265, n. 5, p. E708-E714, Nov. 1993.
- MATHUR, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. **Mediators of Inflammation**, 2008.
- MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, Jul. 1985.
- MATTHEWS, J. N. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **BMJ. (Clinical Research ed.)**, v. 300, n. 6719, p. 230-235, Jan. 1990.
- MCLAUGHLIN, T. et al. Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein. **Circulation**, v. 106, n. 23, p. 2908-2912, Nov. 2002.
- MELLO, T. et al. Expression of carboxylesterase and lipase genes in rat liver cell-types. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, n. 3, p. 460-464, Sep. 2008.
- MILANESE, C. et al. Effect of low-intensity, low-frequency ultrasound treatment on anthropometry, subcutaneous adipose tissue, and body composition of young normal weight females. **Journal of Cosmetic Dermatolcosmetic Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 202-207, Sep. 2014.
- MITCHELL, J. H.; SPROULE, B. J.; CHAPMAN, C. B. The physiological meaning of the maximal oxygen intake test. **Journal of Clinical Investigation**, v. 37, n. 4, p. 538, Apr. 1958.
- MIWA, H. et al. Effect of ultrasound application on fat mobilization. **Pathophysiology**, v. 9, n. 1, p. 13-19, Oct. 2002.
- MIYOSHI, H. et al. Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 996-1002, Jan. 2007.
- MONJO, M.; PUJOL, E.; ROCA, P.  $\alpha$ 2-to  $\beta$ 3-Adrenoceptor switch in 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes: modulation by testosterone,  $17\beta$ -estradiol, and

- progesterone. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 1, p. E145-E150, Jul. 2005.
- MORASKA, A. F. et al. Changes in blood flow and cellular metabolism at a myofascial trigger point with trigger point release (ischemic compression): a proof-of-principle pilot study. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 94, n. 1, p. 196-200, Jan. 2013.
- MORENO-MORAGA, J. et al. Body contouring by non-Invasive transdermal focused ultrasound. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 4, p. 315–323, Apr. 2007.
- MORO, C. et al. Influence of lipolysis and fatty acid availability on fuel selection during exercise. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 583-591, Jun. 2014.
- MUJUMDAR, P. P. et al. Long-term, progressive, aerobic training increases adiponectin in middle-aged, overweight, untrained males and females. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 71, n. 2, p. 101-107, Apr. 2011.
- MÜNZBERG, H.; MYERS, M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 566-570, May 2005.
- NARA, N. et al. Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity-induced insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30794-30803, Oct. 2007.
- NASSAR, A. H. et al. A Randomized, Controlled Clinical Study to Investigate the Safety and Efficacy of Acoustic Wave Therapy in Body Contouring. **Dermatologic Surgery**, v. 41, n. 3, p. 366-370, Mar 2015.
- NOAKES, T. D. Physiological models to understand exercise fatigue and the adaptations that predict or enhance athletic performance. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 10, n. 3, p. 123-145, Jun. 2000.
- NUNES-SILVA, A. et al. Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. an intravital microscopy study. **PloS One**, v. 9, n. 5, p. e96464, May 2014.
- NYBORG, W. L. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: general review. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 27, n. 3, p. 301-333, Mar. 2001.
- OLIVEIRA, C. V. C. D. **Efeitos da suplementação de carboidratos na prevenção do estado de overtraining em rato wistar**: aspectos bioquímicos, hormonais e moleculares. Dissertação de mestrado - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa - PB: [s.n.]. 2013. p. 80f.
- OMAR, B. et al. Regulation of AMP-activated protein kinase by cAMP in adipocytes: roles for phosphodiesterases, protein kinase B, protein kinase A, Epac and lipolysis. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 5, p. 760-766, May 2009.
- OUNIS, O. B. et al. Two-month effects of individualized exercise training with or without caloric restriction on plasma adipocytokine levels in obese female adolescents. **In Annales d'endocrinologie**, v. 70, n. 4, p. 235-241, Sep. 2009.

- PALUMBO, P. et al. Biological effects of low frequency high intensity ultrasound application on ex vivo human adipose tissue. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 411-422, Apr. 2011.
- PANAROTTO, D. et al. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. **European journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 2, p. 84-92, Feb. 2002.
- PAŘÍZKOVÁ, J.; STAŇKOVÁ, L. Influence of physical activity on a treadmill on the metabolism of adipose tissue in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 18, n. 01, p. 325-332, Feb. 1964.
- PARK, H. et al. Indirect low-intensity ultrasonic stimulation for tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 1, n. 1, p. 973530, Jan.-Dec. 2010.
- PARK, K. S.; LIM, J.W.; KIM, H. Inhibitory Mechanism of Omega-3 Fatty Acids in Pancreatic Inflammation and Apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1171, n. 1, p. 421-427, Aug. 2009.
- PASQUALI, R. Obesity and androgens: facts and perspectives. **Fertility and Sterility**, p. 1319-1340, May. 2006.
- PEAKE, J. M. et al. Metabolic and hormonal responses to isoenergetic high-intensity interval exercise and continuous moderate-intensity exercise. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 7, p. E539-E552, Oct. 2014.
- PEDERSEN, B.K; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p.1055-1081, Jul. 2000.
- PERSEGHIN, G. et al. Incorporation of the fasting plasma FFA concentration into QUICKI improves its association with insulin sensitivity in nonobese individuals. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4776-4781, Oct. 2001.
- PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 4, p. 1154-1162, Apr. 2005.
- PINILLA, L. et al. Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. **European Journal of Endocrinology**, v. 140, n. 5, p. 468-473, May. 1999.
- PINTANA, H.; CHATTIPAKORN, N.; CHATTIPAKORN, S. Testosterone deficiency, insulin-resistant obesity and cognitive function. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 4, p. 1-24, Aug. 2015.
- PITTELOUD, N. et al. Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. **Diabetes Care**, v. 28, n. 7, p. 1636-1642, Jul. 2005.
- QUNTÃO-JÚNIOR, J. F. et al. Morphology and contractility in cardiomyocytes of rats with low exercise performance. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 5, p. 431-436, May. 2012.
- RAMSAY, T. G. Porcine leptin inhibits lipogenesis in porcine adipocytes. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 12, p. 3008-3017, Dec. 2003.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing

committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov. 1993.

RESOURCES & Education. **American Society of Plastic Surgeons**, 2014.  
Disponível em: <<http://www.plasticsurgery.org/for-medical-professionals.html>>.  
Acesso em: 2015 May. 10.

RIVEST, S. E. R. G. E.; RICHARD, D. E. N. I. S. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions do not prevent anorectic effect of exercise in male rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 259, n. 3, p. R579-R584, Sep. 1990.

ROBERTSON, V. et al. **Eletroterapia explicada: princípios e prática**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

ROBERTSON, V. J.; BAKER, K. G. A review of therapeutic ultrasound: effectiveness studies. **Physical Therapy**, v. 81, n. 7, p. 1339-1350, Jul. 2001.

SAEDI, N.; KAMINER, M. New waves for fat reduction: high-intensity focused ultrasound. **Seminars Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, n. 1, p. 26-30, Mar. 2013.

SAITO, M. et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans effects of cold exposure and adiposity. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1526-1531, Jul. 2009.

SAMAAN, M. C. The macrophage at the intersection of immunity and metabolism in obesity. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 3, n. 1, p. 29, Oct. 2011.

SCHLÖSSER, A.; CAMARGO, B. V. Representações sociais da beleza física para modelos fotográficos e não modelos. **Psico**, v. 46, n. 2, p. 274-282, Abr./Jun. 2015.

SCHWEIGER, M. et al. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40236-40241, Dec. 2006.

SEGAWA, M. et al. Effect of running training on brown adipose tissue activity in rats: a reevaluation. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 100, n. 1, p. 77-82, Apr. 1998.

SELL, H.; ECKEL, J. Chemotactic cytokines, obesity and type 2 diabetes: in vivo and in vitro evidence for a possible causal correlation? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 4, p. 378-384, Nov. 2009.

SENN, J. J. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 26865-26875, Sep. 2006.

SHALOM, A. et al. Safety and tolerability of a focused ultrasound device for treatment of adipose tissue in subjects undergoing abdominoplasty: a placebo-control pilot study. **Dermatologic Surgery**, v. 39, n. 5, p. 744-751, May. 2013.

SHEK, S. Y. et al. Efficacy of high-intensity focused ultrasonography for noninvasive body sculpting in Chinese patients. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 46, n. 4, p. 263-269, Apr. 2014.

SLOCUM, N. et al. Responses of brown adipose tissue to diet-induced obesity, exercise, dietary restriction and ephedrine treatment. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 5, p. 549-557, Jul. 2013.

SONI, K. G. et al. Carboxylesterase 3 (EC 3.1. 1.1) is a major adipocyte lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40683-40689, Jun. 2004.

SOTHMANN, M. S. et al. Exercise training and the cross-stressor adaptation hypothesis. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 24, n. 1, p. 267-288, Jan. 1996.

SPRIET, L. L. New insights into the interaction of carbohydrate and fat metabolism during exercise. **Sports Medicine**, v. 44, n. 1, p. 87-96, May. 2014.

STALLKNECHT, B. et al. Diminished epinephrine response to hypoglycemia despite enlarged adrenal medulla in trained rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 259, n. 5, p. R998-R1003, Nov. 1990.

STALLKNECHT, B. et al. Role of the sympathoadrenergic system in adipose tissue metabolism during exercise in humans. **The Journal of physiology**, v. 536, n. 1, p. 283-294, Oct. 2001.

STANSBIE, D. A. V. I. D. et al. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. **The Biochemical Journal**, v. 160, n. 2, p. 413-416, Nov. 1976.

STELZER, I. et al. Link between leptin and interleukin-6 levels in the initial phase of obesity related inflammation. **Translational Research**, v. 159, n. 2, p. 118-124, Feb. 2012.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **The Lancet**, v. 365, n. 9467, p. 1333-1346, Apr. 2005.

TAHERGORABI, Z.; RASHIDI, B.; KHAZAEI, M. Ghrelin Does not Alter Aortic Intima-Media Thickness and Adipose Tissue Characteristics in Control and Obese Mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, n. 8, p. 941-945, Aug. 2013.

TCHOUKALOVA, Y. D. et al. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 42, p. 18226-, Oct. 2010.

TER HAAR, G. Principles of High-Intensity Focused Ultrasound. In: MUELLER, P.; ADAM, A. **Interventional Oncology: A Practical Guide for the Interventional Radiologist**. [S.l.]: Springer New York, 2012. p. 51-63.

TESSIER, S. et al. Impact of walking on adipose tissue lipoprotein lipase activity and expression in pre-and postmenopausal women. **Obesity facts**, v. 3, n. 3, p. 191-199, Jun. 2010.

TREMBLAY, M. S.; COPELAND, J. L.; VAN HELDER, W. Effect of training status and exercise mode on endogenous steroid hormones in men. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 2, p. 531-539, Feb. 2004.

TURNER, T. **Specific levels of therapeutic ultrasound stimulate the release of inflammatory and angiogenic mediators from macrophages in culture**. Dissertation of Doctor of Philosophy - Virginia Commonwealth University. Richmond, Virginia - USA: [s.n.]. Aug. 2009. p. 223f.



- VALLERIE, S. N. et al. A predominant role for parenchymal c-Jun amino terminal kinase (JNK) in the regulation of systemic insulin sensitivity. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. e3151-e3151, Sep. 2008.
- VAN HERPEN, N. A.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 2, p. 231-241, May. 2008.
- VERNOCHET, C. et al. C/EBP $\alpha$  and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 17, p. 4714-4728, Sep. 2009.
- VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 5, p. E1164-E1171, May. 2009.
- VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M. et al. Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. **Acta histochemica**, v. 113, n. 2, p. 214-220, Feb. 2011.
- VIGNOZZI, L. et al. Testosterone protects from metabolic syndrome associated prostate inflammation: an experimental study in rabbit. **The Journal of Endocrinology**, v.212, n. 1, p. 71-84, Jan. 2012.
- VIRU, A. A. **Hormonal esemble in exercise**. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, v. 2, 1985. 208 p.
- VIRU, M. et al. Effect of restricted blood flow on exercise-induced hormone changes in healthy men. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 77, n. 6, p. 517-522, May. 1998.
- WAN, Z. et al. Evidence for the role of AMPK in regulating PGC-1 alpha expression and mitochondrial proteins in mouse epididymal adipose tissue. **Obesity**, v. 22, n. 3, p. 730-738, Mar. 2014.
- WANNER, S. P. et al. Muscarinic receptors within the ventromedial hypothalamic nuclei modulate metabolic rate during physical exercise. **Neuroscience Letters**, v. 488, n. 2, p. 210-214, Jan. 2011.
- World Health Organization. **WHO Global Infobase: Data for saving lives, 2010**. Disponivel em: <<http://www.who.int/infobase/report.aspx?rid=111&iso=BRA&gobutton=Go>>. Acesso em: 05 Jul. 2015.
- WU, M. V. et al. Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats impact on whole-body energy expenditure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 49, p. 34129-34140, Dec. 2014.
- XIA, J. W. et al. Correlation of serum testosterone with insulin resistance in elderly male type 2 diabetes mellitus patients with osteoporosis. **Journal of Diabetes Investigation**, v.6, n.5, Sep. 2015.
- XU, X. et al. Postreceptor events involved in the up-regulation of beta-adrenergic receptor mediated lipolysis by testosterone in rat white adipocytes. **Endocrinology**, v.132, n.4, p.1651-1657, Apr. 1993.

YAO, M. et al. A pilot study evaluating noncontact low frequency ultrasound and underlying molecular mechanism on diabetic foot ulcers. **International Wound Journal**, v. 11, n. 6, p. 586-593, Dec. 2014.

YOON, S. S. et al. Effects of statins on serum inflammatory markers: the US National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 17, n. 11, p. 1176-1182, Nov. 2010.

ZECCHIN, H. G. et al. Insulin signalling pathways in aorta and muscle from two animal models of insulin resistance—the obese middle-aged and the spontaneously hypertensive rats. **Diabetologia**, v. 46, n. 4, p. 479-491, Apr. 2003.

ZECCHIN, H. G.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Mecanismos moleculares da resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 14, n. 4, p. 574-589, 2004.

ZHAO, J. et al. Endurance exercise is a leptin signaling mimetic in hypothalamus of Wistar rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 225, Dec. 2011.

ZHANG, Z. J. et al. The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 29, n.11, p. 1645–1651, Nov. 2003.

ZMUDA, J. M.; THOMPSON, P. D.; WINTERS, S. J. Exercise increases serum testosterone and sex hormone-binding globulin levels in older men. **Metabolism**, v. 45, n. 8, p. 935-939, Aug. 1996.

ZOTH, N. et al. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, n. 1, p. 100-105, Oct. 2010.