



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

**O TREINAMENTO DE NATAÇÃO INDUZ ADAPTAÇÕES HEPÁTICAS
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E SOBRE A SENSIBILIDADE À
INSULINA EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA RICA EM GORDURA**

ALINE CRUZ ZACARIAS

Ouro Preto - MG

Julho/ 2016

Aline Cruz Zacarias

**O TREINAMENTO DE NATAÇÃO INDUZ ADAPTAÇÕES HEPÁTICAS
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E SOBRE A SENSIBILIDADE À
INSULINA EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA RICA EM GORDURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia/ Ciências da Vida

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andréia Carvalho Alzamora

**Ouro Preto - MG
Julho/ 2016**

Z13t Zacarias, Aline Cruz.
O treinamento de natação induz adaptações hepáticas sobre o estresse oxidativo e sobre a sensibilidade à insulina em ratos submetidos à dieta rica em gordura [manuscrito] / Aline Cruz Zacarias. - 2016.
40f.: il.: color, grafis, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Andréia Carvalho Alzamora.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Dieta - hiperlipídica. 2. Exercícios físicos. 3. Estresse oxidativo - Fígado. 4. Insulina - Fígado. I. Alzamora, Andréia Carvalho. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 577.12

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"Treinamento de natação induz a adaptações hepáticas sobre o estresse oxidativo e sobre a sensibilidade à insulina em ratos submetidos à dieta rica em gordura"

Aos catorze dias do mês de julho de 2016, às 09:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Aline Cruz Zacarias. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Daniela Caldeira Costa
Examinadora (UFOP)

Prof. Dr. Romulo Leite
Examinador(UFOP)

Prof.ª Dr.ª Andréia Carvalho Alzamora
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **14/07/2016**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS



NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559-1681

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Hipertensão da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio financeiro da Capes, da Propp-Ufop, do Pronex-CNPq, da Fapemig; da Rede Toxifar e do Nupeb-Ufop.

Dedicatória

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação me deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por nunca me abandonar e por me dar paciência, força e fé para completar esta caminhada.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Andréia Carvalho Alzamora pela oportunidade, confiança, amizade e conhecimentos.

Aos meus pais, Edna e João, por sempre acreditarem em mim, apoiando-me e incentivando nos momentos de alegria e tristeza, também pelo exemplo de vida.

À minha irmã Amanda por fazer parte da minha vida.

Aos meus tios e tias, Maria, Ana Maria, Joana, Neide, Beth, Rosa, Elisa, Helena, José, Chiquito, Geraldo, primos Gilvânia, Miguel, Wátilla, Dayana, Danielle, Emmanuelle e Heder, e amigos Lilian, Rodrigo, Dorotéia, estribadas e Amauri, pela paciência, apoio, força, conversas e por estarem sempre comigo.

Aos amigos do laboratório, Claudiane, Maria Andréa, Grazi, Uberdan, Taynara, Mayara, Hiliane, Isadora, kairo, Raphaela, Lidia, Raquel, Rosana, Denise, Everton, Giovana, Nádia, Renato, Paula, Mileide, pela amizade, ensinamentos, diversão, colaboração e desabafos.

Aos meus anjos da guarda: Felipe, pelo incentivo e auxílio para estudar para prova do mestrado e pelas conversas e conselhos; Nícia, Keila, Karina e Camila (LAFEX), Renata e Ana Carla (LBBM), Jaime, Hebert, Mirian (LIP), Carlos, Luciana (LIMP), pela imensa prontidão e colaboração, sem elas não seria possível a realização deste trabalho; Jair (Laboratório de Nutrição Experimental), pela colaboração; Miltinho; Marli; funcionários do CCA, principalmente Estela e Chiquinha, pelo incentivo.

Em especial ao Prof. Dr. Frank Bezerra pela imensa prontidão e colaboração neste trabalho; à Prof^a. Dr^a. Lenice Kappes, pelas conversas, desabafos e conselhos; ao professor Prof. Dr. Wanderson Lima, pelo auxílio na histologia; e ao professor Prof. Dr. Mauro Isoldi, pela ajuda na forma de se fazer e analisar alguns experimentos.

Em especial também ao amigo de laboratório e orientador do TCC, Prof. Dr. Luiz Eduardo de Sousa, pela oportunidade, confiança, conversa e amizade.

Aos colegas e professores do Nupeb, pela amizade, colaboração e ensinamentos.

À Fapemig, à Rede Toxifar, ao CNPq, ao INCT Nanobiofarmacêutica e ao Pronex (Fapemig/ CNPq), pelo apoio financeiro.

Aos animais que, com inocência, sacrificam suas vidas pela ciência.

RESUMO

O estresse oxidativo tem sido considerado importante fator para a progressão de distúrbios hepáticos em doenças crônicas metabólicas, como na síndrome metabólica (SM). A ocorrência da SM relaciona-se ao sedentarismo e à dieta hiperlipídica. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito terapêutico do treinamento físico em animais com SM induzida pela dieta hiperlipídica sobre o estresse oxidativo e sobre a via de sinalização da insulina no fígado. Ratos *fisher* após o desmame foram alimentados com dieta padrão AIN-93 ou dieta hiperlipídica (30% de banha) por 13 semanas. Nas seis últimas semanas da dieta, foram submetidos ao treinamento físico (TF) natação, com carga de até 2,5% do peso corporal ou mantidos sedentários (SED). Ao final das 13 semanas de experimento foram realizadas avaliações biométricas, bioquímicas, do condicionamento físico, do estresse oxidativo e da expressão gênica do PPAR γ e da via da sinalização da insulina. Os ratos submetidos à dieta hiperlipídica SED apresentaram aumento de peso corporal, tecido adiposo retroperitoneal, colesterol total, alanina aminotransferase (ALT), glicemia, insulina, da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e lactato sanguíneo. No fígado, ocorreu aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), peroxidação lipídica (TBARS), proteína carbonilada, glutatona oxidada e diminuição da atividade da catalase (CAT) e da relação glutatona reduzida/ oxidada (GSH/GSSG), além da redução da expressão gênica de Inrs, Irs-1, Irs2, Akt-2 e GLUT-4, quando comparados aos animais dieta padrão SED. O tratamento com o treinamento físico nos animais submetidos à dieta hiperlipídica melhorou o condicionamento físico e reduziu o peso corporal, o tecido adiposo retroperitoneal, os níveis de glicemia, insulina, PAM e FC e, no fígado, restaurou a atividade da SOD e da catalase e da relação GSH/GSSG, além de elevar a expressão gênica do PPAR γ , Inrs, Irs-1, Akt-2 e GLUT-4 em comparação aos animais submetidos à dieta hiperlipídica SED. Nossos dados em conjunto mostram que o treinamento físico conseguiu reverter o aumento de espécie reativa de oxigênio (EROS) induzido pela dieta hiperlipídica e, assim, manter preservado o estado redox do fígado. Sugere, portanto, que a modulação de sistemas moleculares específicos induzidos pelo treinamento físico foi eficiente em restaurar a via de sinalização de insulina nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica e treinados.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica. Treinamento físico. Estresse oxidativo no fígado. Via de sinalização da insulina no fígado.

ABSTRACT

Oxidative stress has been considered an important factor in the progression of hepatic disorders in metabolic chronic diseases such as metabolic syndrome (MS). The occurrence of MS is related to physical inactivity and high fat diet. The objective of this study was to evaluate the therapeutic effect of physical training in animals with MS induced by high-fat diet on oxidative stress and on the insulin signaling pathway in the liver. Fisher rats after weaning were fed with standard diet AIN-93 (CT) or high-fat diet (30% FAT) for 13 weeks and submitted, for the last 6 weeks of diet, to the physical training (PT) swimming with workload up to 2.5 % of body weight or maintained sedentary (SED). At the end of the 13th week of the protocol were performed biometric, biochemical, physical fitness, oxidative stress and gene expression of PPAR γ and insulin signaling pathway evaluations. The FAT-SED rats showed increase in body weight, retroperitoneal fat, total cholesterol, alanine aminotransferase (ALT), lactate, glucose and insulin in blood, mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). In the liver was increased the activity of superoxide dismutase (SOD), lipid peroxidation (TBARS), protein carbonyl, oxidized glutathione and decreased activity of catalase (CAT) and glutathione/ oxidized (GSH / GSSG) ratio, gene expression of Irs-1, Irs-2, Akt-2 and GLUT-4 compared to CT-SED animals. Treatment with physical training in FAT-PT animals improved fitness and reduced body weight, retroperitoneal fat, blood levels of glucose, insulin, total cholesterol, MAP and HR and in liver increased the activity of SOD and catalase, GSH/ GSSG ratio, the gene expression of PPAR γ , INRS, Irs-1, Akt-2 and GLUT-4 compared to FAT-SED animals. Our data together show that physical training was able to reverse the increase of ROS induced by fat diet and hence the redox state of the liver remained preserved, suggesting that the modulation of specific molecular systems induced by physical training was effective in restoring the insulin signaling pathway in high fat diet rats.

Key words: Physical training. Oxidative stress. Insulin signaling pathway. High-fat diet and liver.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Hipertrofia do tecido adiposo

Figura 2 – Sistema enzimático oxidante/ antioxidante

Figura 3 – Representação esquemática do complexo Glutathione

Figura 1 – Hormesis e exercício

Figura 5 – Protocolo experimental e treinamento físico natação

Figura 6 – Treinamento Físico

Figura 7 – Atividade das enzimas antioxidante superóxido dismutase e catalase e dano avaliado

Figura 8 - Complexo glutathione no fígado

Figura 9 - Avaliação da expressão gênica de mediadores da via de sinalização de insulina no fígado

Figura 10 - Avaliação da expressão gênica do peroxissoma do receptor gama ativado

Figura 11 – Exame histológico do fígado

Quadro 1 – Sumário

Quadro 2 – Avaliação do estresse oxidativo no fígado

Quadro 3 – Avaliação da via de sinalização da insulina no fígado

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre dieta controle AIN-93 e hiperlipídica

Tabela 2 – Sequências de *primers* usados na análise de qRT-PCR

Tabela 3 – Valores da pressão arterial média (mmHg), frequência cardíaca (bpm) mensuradas por meio da pletismografia de cauda e peso corporal (g) na 7^a semana após o início das dietas hiperlipídica ou padrão

Tabela 4 – Parâmetros biométricos de ratos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta padrão e submetidos ao treinamento físico ou sedentários

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos e cardiovasculares de ratos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta padrão e submetidos ao treinamento físico ou sedentários

LISTA DE ABREVEATURAS

AKT	Serina/treonina quinase
ALT	Alamino aninotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BPM	Batimento por minuto
CAT	Catalase
CCA	Centro de Ciências Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTB	Ácido 5,5'-ditiobis -(2- nitrobenzólico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra- acético
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
EROs	Espécie reativa de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
GLUT-4	Transportador de glicose tipo- 4
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H₂NO₂	Ácido nitroso
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LABNEX	Laboratório de Nutrição Experimental
LAPAC	Laboratório Pitolo de Análises Clínicas
MCP	Quimiotática de monócito
N₂O₃	Trióxido de Nitrogênio
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NO	Óxido nítrico
NO₃⁻	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂	Oxigênio
O₂⁻	Ânion superóxido
·OH	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peróxinitrito
ONU	Organização das nações unidas
PAM	Pressão Arterial Média
PBS	Tampão fosfato
PGC1-α	Proliferador do receptor coativador gama 1- alfa
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PPAR	Receptor proliferador de peroxissoma

qRT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RI	Resistência à insulina
RL	Radical livre
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
SBD	Sociedade Brasileira de Diabétes
SED	Sedentário
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
SSA	Ácido sulfasalílicico
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TF	Treinamento físico
TG	Triglicerídeos
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UCP	Proteína desacopladora
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
VO₂	Volume de oxigênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Obesidade	2
1.2 Fígado	5
1.3 Via de sinalização da insulina e a expressão do PPAR γ no fígado	6
1.4 Estresse oxidativo	8
1.5 Treinamento físico	11
2. JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 Animais.....	18
4.2 Grupos experimentais	18
4.3 Indução da síndrome metabólica	19
4.4 Treinamento físico	20
4.5 Avaliação indireta da pressão arterial média por meio da pletismografia de cauda.	21
4.7 Coleta dos tecidos e órgãos	22
4.8 Análises bioquímicas	22
4.9 Proteínas totais.....	23
4.10 Atividade superóxido dismutase.....	25
4.11 Atividade da enzima catalase	25
4.12 Glutationa total	26
4.13 Ácido tiobarbitúrico.....	27
4.14 Proteína carbonilada	27
4.15 Expressão do mRNA da via de sinalização da insulina no fígado.....	28
4.16 Curva de eficiência e amplificação dos <i>primers</i>	32
4.17 Análise histológica	32
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
6 RESULTADOS	34
6.1 Caracterização de distúrbios da síndrome metabólica.....	34
6.2 Massa corporal e peso dos órgãos	34
6.3 Avaliações bioquímicas, cardiovasculares e de condicionamento físico	35
6.4 Atividade das enzimas antioxidante superóxido dismutase e catalase e dano avaliado pela peroxidação lipídica e pela proteína carbonilada no fígado.....	37
6.5 Complexo glutaciona no fígado	38
6.6 Via de sinalização da insulina	40

6.7 Expressão gênica do PPAR γ 2 no fígado	43
6.8 Avaliação histológica do Fígado	43
7 DISCUSSÃO	47
8 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é uma doença contemporânea definida pela associação, num mesmo indivíduo, de três ou mais fatores de risco, como dislipidemia, diabetes mellitus do tipo 2 ou intolerância à glicose, hipertensão arterial e excesso de peso ou obesidade. A obesidade caracteriza-se pelo aumento de tecido adiposo que não apenas armazena energia, mas também, é um órgão que possui atividade endócrina com funções importantes na regulação da inflamação como do metabolismo energético (De Luca e Olefsky, 2008; Franssen *et al.*, 2011).

As alterações metabólicas – associadas às mudanças na expressão gênica de citocinas inflamatórias e na angiogênese do adipócito por diferentes mecanismos em diversos órgãos e tecidos – são responsáveis pela redistribuição da sinalização celular e molecular tanto no tecido adiposo como em outros tecidos (Attie e Scherer, 2009). Isso sugere a participação de fatores de transcrição, mediadores inflamatórios e formação de radicais livres (RL) no desenvolvimento da obesidade. Além disso, indivíduos com SM apresentam maior prevalência de deposição gordurosa no fígado, aumentando a disponibilidade de ácidos graxos livres e as alterações no metabolismo lipídico hepático.

Já é bem relatado que dieta hiperlipídica, falta de exercício físico e obesidade podem prejudicar as vias de sinalização celular da mesma forma que estimular a produção de RL com efeitos negativos à saúde (Ropelle *et al.*). Não obstante, tal quadro patológico provoca um excesso de ácidos graxos livres, o que aumenta a resistência à insulina. Esse aporte excessivo promove o esgotamento da capacidade de oxidação mitocondrial, bem como a ativação de outras vias de oxidação lipídica que geram estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas). Nessas situações, a espécie reativa de oxigênio (ERO) em excesso pode oxidar e danificar lipídios celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação e, frequentemente, à sua inutilização, o que inibe a sua função normal (Valko *et al.*, 2007).

O treinamento físico tem sido relacionado como importante recurso, não medicamentoso, para auxiliar no tratamento ou como forma de prevenção da obesidade.

Isso porque aumenta o gasto energético diário, além de contribuir para a melhora da sinalização celular e do sistema antioxidante (Pauli *et al.*, 2010).

Durante o treinamento físico, ocorre um crescimento da demanda metabólica na musculatura ativa; o corpo responde aumentando o consumo de oxigênio e o fluxo sanguíneo, o que acarreta a maior produção de espécie reativa de oxigênio. Porém, a indução do estresse oxidativo pelo treinamento físico depende do tipo, da intensidade e da duração do exercício. O treinamento físico de baixa a moderada intensidade eleva a biodisponibilidade de óxido nítrico, melhora a função endotelial (Battault *et al.*, 2016) e leva a adaptações importantes, como angiogênese, biogênese, mitocôndrias e hipertrofia muscular (JUNA, 2015).

Entretanto, há informações limitadas sobre o efeito do exercício físico no balanço do estresse oxidativo como tratamento em animais com síndrome metabólica já estabelecida no fígado. A maioria dos estudos tem se concentrado em parâmetros fisiológicos e bioquímicos ou utiliza o treinamento físico como prevenção.

Assim, queremos saber o balanço oxidante/antioxidante depois da síndrome metabólica já estabelecida e após seis semanas de intervenção com treinamento físico (natação) no fígado de ratos *fisher*, além de examinar o dano causado pela dieta e pelo sedentarismo e a efetividade do treinamento físico.

1.1 Obesidade

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a obesidade é considerada um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Estima-se que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões, obesos. No Brasil, há um crescimento da obesidade. Levantamentos apontam que mais de 50% da população está com sobrepeso ou com obesidade. Isto ocorre devido à alimentação inadequada e a um estilo de vida sedentário. A obesidade está intimamente associada a várias condições e patologias, incluindo hipertensão, diabetes tipo 2, dislipidemia, doença renal, doenças cardíacas, câncer, apneia obstrutiva do sono e osteoartrite (Kopelman, 2000).

A obesidade é definida por um acúmulo excessivo de gordura corporal em um indivíduo, ou seja, há um aumento do volume dos adipócitos (hipertrofia), de seu número (hiperplasia) ou uma forma combinada (hipertrofia-hiperplasia). Esse

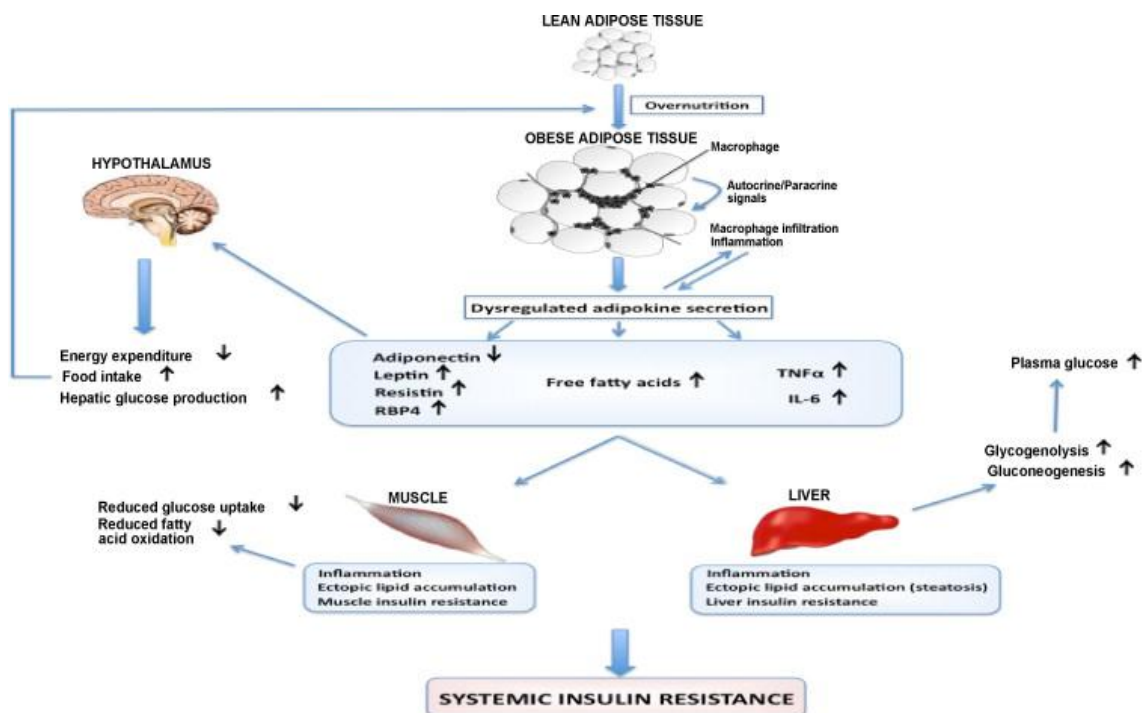
crescimento dos adipócitos afeta tanto a sensibilidade à insulina como a expressão e secreção de várias adipocinas (Wang e Hai, 2015).

Há dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM). O primeiro funciona como órgão metabólico responsável pela absorção, síntese e armazenamento de lipídeos sob a forma de triglicerídeos (TG). Os TG são mobilizados liberando os ácidos graxos e glicerol, em uma situação de jejum ou exercício prolongado. O TAB também pode realizar funções endócrinas, quando secreta adipocitocinas, tais como adiponectina sob condições normais e libera citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral- α (TNF- α); interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8 e quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) na obesidade (Wang e Hai, 2015).

Estudos sugerem que a obesidade está associada a mudanças na expressão gênica nos adipócitos com diferentes vias metabólicas e em diferentes órgãos e tecidos, resultando em ações metabólicas e sinais moleculares ((Attie e Scherer, 2009). Está associada, ainda, com a resposta inflamatória crônica de baixo grau (Sakurai *et al.*, 2009).

A Figura 1 mostra que a hipertrofia dos adipócitos leva a infiltração de macrófagos M1, que exercem importante função no controle de várias infecções bacterianas, aumentando, assim, a inflamação e a desregulação da produção e da secreção de adipocinas. Esse quadro acarreta uma elevação da ingestão alimentar e da produção de glicose hepática e uma diminuição do gasto energético por meio de ações no hipotálamo. Sendo assim, há uma redução da sensibilidade à insulina no fígado e no músculo, devido ao aumento do acúmulo de lipídeo associado à inflamação.

Figura 1 – Hipertrofia do tecido adiposo



Legenda: Hipertrofia do tecido adiposo induz a infiltração e a proliferação de macrófagos e a alteração na secreção de adipocinas, levando à inflamação crônica de baixa intensidade. Esse quadro, associado ao aumento de ácidos graxos livres circulantes, provoca crescimento de ingestão alimentar, diminuição do gasto energético, além da mudança na homeostase de tecidos periféricos, como músculo e fígado, o que promove o acúmulo ectópico de gordura, inflamação e resistência à insulina.

Fonte: (Galic *et al.*, 2010).

O TAM é composto por adipócitos com função termogênica que converte energia química em calor, devido à abundância de mitocôndria, através das proteínas desacopladoras (UCPs). É controlado, principalmente, pelo sistema nervoso simpático (Nam e Cooper, 2015). As UCPs localizam-se na membrana interna da mitocôndria e têm função de translocação dos prótons e elétrons do espaço interno da membrana para a matriz mitocondrial, dissipando o gradiente de prótons (Ricquier *et al.*, 1991).

Liu *et al.* (2013) descrevem proteínas homologas a UCP-1, como a UCP-2, expressa em diferentes tecidos e atua na regulação negativa da secreção de insulina por células β e no metabolismo dos ácidos graxos. Outro exemplo é a UCP-3, manifestada no TAM e no músculo esquelético, desempenha um papel no metabolismo do ácido graxo e na homeostase de energia, além de modular a sensibilidade à insulina. Já a UCP-4 está presente apenas no cérebro (Liu *et al.*, 2013).

Além dessas funções no TAM, o alto potencial de membrana da mitocôndria pode induzir a produção de ERO e o dano oxidativo. Este é capaz de ativar

a UCPs e, portanto, causar um “leve desacoplamento”, o que (como um *feedback* negativo) vai impedir a produção de superóxido e diminuir, assim, o dano oxidativo (Liu *et al.*, 2013).

Assim, o “leve desacoplamento” da fosforilação oxidativa mitocondrial pode ser considerado como a primeira forma de defesa contra o estresse oxidativo (Green *et al.*, 2004).

1.2 Fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano e a maior glândula, pesando cerca de 1,5kg. É onde os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos. Localiza-se na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, e recebe cerca de 70 a 80% do sangue rico em nutrientes e pouco oxigenado, vindo da veia porta e o restante, cerca de 20%, rico em oxigênio fornecido pela artéria hepática. A posição do fígado no sistema circulatório é ideal para captar, transformar e acumular metabólitos para a neutralização e a eliminação de substâncias tóxicas.

Além disso, exerce função muito importante na produção de proteínas plasmática, como a albumina e outras proteínas carreadoras. Controla, portanto, as substâncias que são absorvidas em todo o intestino e determina quais e como irão entrar na circulação sistêmica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A morfologia do fígado e os tipos de suas células permitem que ele realize várias atividades. Os hepatócitos compõem cerca de 80% do fígado e realizam a maioria das funções sintéticas e secretoras, destacando-se o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, o armazenamento energético e o controle do glicogênio (Rossaint e Zarbock, 2013). Funções metabólicas e secretoras variadas e complexas requerem que os hepatócitos sejam células muito ativas em termos energéticos e de transcrição gênica, por possuírem uma grande quantidade de mitocôndrias no citoplasma (Duncan, 2013).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), hábitos alimentares inapropriados aliados ao sedentarismo acarretam a obesidade com o passar do tempo. Esse quadro pode gerar a doença hepática gordurosa não alcoólica (o tipo mais comum de esteatose hepática), ou seja, o acúmulo de gordura no fígado. Atualmente, 80% dos

pacientes com sobrepeso têm esteatose hepática. Se considerarmos que 25% da população ocidental se encontra acima do peso, uma média de 20% tem a doença.

A esteatose hepática é definida como o acúmulo de triglicérides macrovesicular ou microvesicular, envolvendo, pelo menos, 5% de hepatócitos. Na esteatose macrovesicular, uma única gota grande desloca os conteúdos citoplasmáticos e do núcleo para a periferia da célula. Hepatócitos com esteatose macrovesicular podem conter também pequenas gotículas na formação de um anel entorno da maior ou várias pequenas gotículas sem uma gota maior. A verdadeira esteatose microvesicular dá uma aparência de espuma para o citoplasma dos pequenos vacúolos inumeráveis e, geralmente, recua o núcleo central retida (Aly e Kleiner, 2011).

A obesidade gera o aumento dos ácidos graxos livres circulantes que pode levar ao quadro de resistência insulínica, que são captados e depositados dentro do hepatócito. Esse depósito ativa a cascata inflamatória, modulada por uma série de citocinas, incluindo as adipocitocinas, e resulta em exacerbação do estresse oxidativo – processo fundamental à progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica para a fibrose (Papandreou *et al.*, 2007).

1.3 Via de sinalização da insulina e a expressão do PPAR γ no fígado

Durante a síndrome metabólica, o aumento da obesidade visceral e o desequilíbrio na produção de adipocinas geram um estado pró-inflamatório crônico do tecido adiposo visceral. Com a progressão da inflamação crônica do tecido adiposo visceral, as adipocinas pró-inflamatórias são secretadas na corrente sanguínea e podem promover diversos distúrbios metabólicos sistêmicos, por exemplo, no fígado, com a resistência à insulina (Videla *et al.*, 2006). Há outros fatores que também são alterados durante a síndrome metabólica, como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) (Ahmadian *et al.*, 2013) e o estresse oxidativo (Li *et al.*, 2015).

A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. O hormônio é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a

lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica (HOTAMISLIGI, 2006).

A resistência à insulina é definida como a diminuição do efeito desse hormônio sobre o metabolismo da glicose, sua absorção e seu armazenamento. Há uma redução da absorção de glicose estimulada pela insulina no músculo esquelético e no tecido adiposo, além da deficiência na supressão da produção de glicose no fígado. Tais defeitos podem ser determinados pela deficiência na sinalização da insulina ou por *down regulation* do transportador da glicose, o GLUT4 (Formiguera e Cantón, 2004). Para compensar a resposta inadequada, as células β pancreáticas aumentam a produção de insulina, levando à hiperinsulinemia (Dominici *et al.*, 2014).

O receptor de insulina (IR) é formado por duas subunidades α e duas subunidades β . A ligação da insulina à subunidade α ocasiona a ativação da atividade cinase da subunidade β , seguida pela autofosforilação dos resíduos de tirosina e pelo aumento na atividade cinase. A cinase do IR fosforila os resíduos de tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRS) 1 e 2. Quando os resíduos de tirosina do IRS 1 e 2 são fosforilados, os IRS ligam-se ao fosfatidilinositol 3 – quinase (PI3K), ativando-o. A PI3K converte o seu substrato, fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2), no mensageiro lipídico fosfatidilinositol 3,4,5 – trifosfato (PIP3). O PIP3 então se liga a proteína cinase B (AKT). A AKT continua a propagação do sinal hormonal ao ativar a proteína AS160, que sensibiliza as pequenas proteínas ao redor do transportador de glicose (GLUT-4), favorecendo a sua translocação até a membrana lipídica para captação da glicose (Westhoff *et al.*, 2007).

Os PPARs desempenham papel essencial no desenvolvimento e no metabolismo de carboidrato, lipídios e proteínas. Foram identificados três tipos de PPARs: alfa, beta e gama. O PPAR- α e o PPAR- β têm funções importantes na regulação da β -oxidação no fígado e no músculo esquelético, respectivamente; ao passo que o PPAR- γ está envolvido no sequestro de triglicéridios do tecido adiposo e na expansão global do tecido adiposo.

O PPAR- α inside principalmente no fígado; já PPAR- γ é identificado, sobretudo no tecido adiposo; enquanto o PPAR- β manifesta-se ubiquamente e abundante na maior parte dos tecidos. No entanto, todos os três receptores estão presentes no fígado de rato adulto (Ament *et al.*, 2016). No fígado normal, PPAR- γ é expresso a um nível muito baixo, mas tem sido relatado o alcance de níveis de

expressão funcionalmente significativos no fígado esteatótico, em modelos de diabetes e obesidade (Matsusue *et al.*, 2003).

Dados da literatura demonstram que o PPAR γ está associado com a RI, o metabolismo lipídico e a regulação da inflamação durante a esteatose hepática (Nan *et al.*, 2009), constituindo a isoforma mais importante em estudos sobre a síndrome metabólica.

1.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo tem sido implicado na fisiopatologia de obesidade, hipertensão, disfunção endotelial e SM (Urakawa *et al.*, 2003; Abdilla *et al.*, 2007). O aumento da insulina, de ácidos graxos livres e dos níveis de glicose pode resultar em acréscimo na produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, no estresse oxidativo (Urakawa *et al.*, 2003; Menon *et al.*, 2004).

As mitocôndrias são as principais fontes de espécies reativas de oxigênio celular com o resultado no influxo de elétrons ao longo da cadeia de transporte de elétrons (Murphy, 2009). São organelas essenciais envolvidas na fisiopatologia da obesidade, pois a elevação dos níveis de glicose gera a fragmentação mitocondrial, juntamente a diminuição da mitofusina-2 (MFN2), componente essencial para fusão mitocondrial (Safiedeen *et al.*, 2016).

Em hepatócitos, a integridade da mitocôndria associada à membrana é necessária para a sinalização da insulina. Com efeito, a perda da função da mitofusina-2 na mitocôndria associada à membrana produz disfunção mitocondrial, aumenta a concentração de H₂O₂ e ativa a c-Jun N-terminal quinase (JNK), que conduz a resistência à insulina no músculo esquelético e no fígado. Importante ressaltar que a deficiência MFN2 também conduz ao estresse no retículo endoplasmático (RE), contribuindo, assim, para a perda da sensibilidade à insulina (Sebastián *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e os antioxidantes e resulta no acúmulo intracelular de ERO (Rudich *et al.*, 2007). A formação de espécie reativa se deve ao metabolismo de oxigênio e ao sistema antioxidante, que tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das espécies reativas. Estas espécies possuem vida extremamente curta, são altamente reativos, produzidos em todos os sistemas biológicos

e reagem facilmente com moléculas que se localizam entorno do seu sítio de formação (Roberts e Sindhu, 2009).

As EROs podem ser produzidas por diferentes vias. Entretanto, a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte por possuir vários centros redox, capazes de transferir um elétron da molécula de oxigênio para formar ânion superóxido (Green *et al.*, 2004; Echtay, 2007; Angelopoulou *et al.*, 2009). Em excesso, pode oxidar e danificar lipídios celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação e, frequentemente, à sua inutilização, pois inibe a sua função normal (Valko *et al.*, 2007).

AS EROs incluem radicais livres, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e radicais lipídicos; bem como espécies oxidantes não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio (O_2) (Steinbrenner e Sies, 2009). Estes, apesar de não possuírem átomos com elétrons desemparelhados, são potencialmente geradores desses radicais.

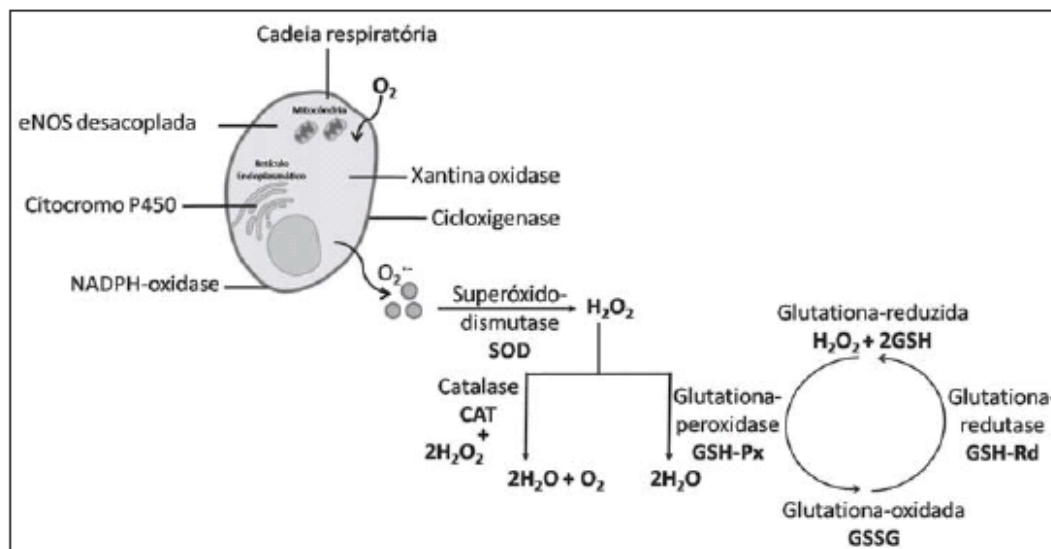
Há também as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que incluem óxido nítrico (NO), trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_3^-), e peroxinitritos (ONOO) (Halliwell e Whiteman, 2004), conforme a Figura 2. Outras importantes enzimas geradoras de radicais livres são NADPH oxidases (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases), xantina oxidase, citocromo p450 monooxigenase, lipoxigenase e óxido nítrico sintase (NOS) (Fukai e Ushio-Fukai, 2011). A NADPH é uma proteína transmembrana com função de transferir elétrons através das membranas celulares e capaz de gerar OH e O_2^- . Ela é composta por duas subunidades ligadas à membrana (p22^{phox} e NOX2), por três subunidades citoplasmáticas (p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox}) e pela proteína G Rac 1 (Ilkun e Boudina, 2013).

Na tentativa de neutralizar e manter a homeostase redox nas células, ocorre a participação de defesas que podem ter origens enzimáticas – como antioxidantes endógenos, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (Roberts e Sindhu, 2009) – ou não enzimáticas – que podem ser classificadas em antioxidantes solúveis em água, incluindo vitamina C (V_C), ácido lipóico (LA) e ácido úrico (AU), ou antioxidante solúveis em lipídios, tais como β -caroteno, vitamina E (V_E) e coenzima Q. Substâncias estas capazes de atrasar ou inibir a oxidação de maneira eficaz.

A principal defesa contra O_2^- e ONOO⁻ é o grupo das SODs. Nos mamíferos, existem três isoenzimas da SOD, codificadas e reguladas de forma independente: a

citossólica (Cu,Zn- SOD ou SOD1), a mitocondrial (Mn-SOD ou SOD2) e uma forma extracelular da Cu,Zn-SOD (ou SOD3). A GPx e a CAT agem de modo integrado, impedindo o acúmulo de H_2O_2 . Tais reações estão representadas na Figura 3.

Figura 2 – Sistema enzimático oxidante/ antioxidante

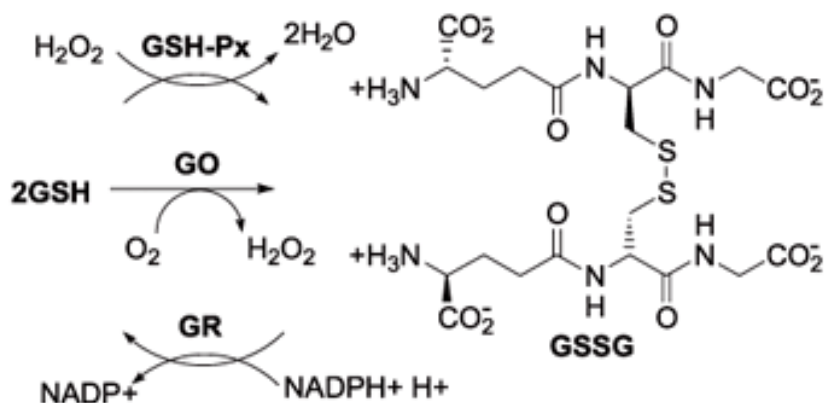


Legenda – Sistema enzimático oxidante/antioxidante eNOS = óxido nítrico sintase endotelial; O_2^- = ânion superóxido; H_2O_2 = peróxido de Hidrogênio.

Fonte: (Delbin *et al.*, 2009).

Há também a glutatona, um tripeptídeo que possui um papel importante na biotransformação e na eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. O complexo glutatona ocorre por meio da atividade de três grupos de enzimas: glutatona oxidase, glutatona peroxidase e glutatona redutase. As duas primeiras enzimas catalisam a oxidação da glutatona à glutatona dissulfeto, e a última é responsável pela regeneração da glutatona, na presença de NADPH (Huber *et al.*, 2008).

Figura 3 – Representação esquemática do complexo Glutathiona



Fonte: HUBER *et al.*, 2008

O desequilíbrio entre os sistemas oxidante e antioxidante ativa o sistema imunológico, estimulando, assim, o início do processo inflamatório a fim de tentar reestabelecer a homeostasia. O processo produz mediadores pró- inflamatórios, que são capazes de manter um estado de ativação crônica do sistema imune, ocasionando uma inflamação sistêmica característica da SM (Duncan e Schmidt, 2001).

1.5 Treinamento físico

Uma das formas, não medicamentosa, de tratar a síndrome metabólica já estabelecida e o estresse oxidativo é realizando o treinamento físico (TF). O estresse oxidativo induzido pelo exercício depende do tipo, da intensidade e da duração do exercício (KÖNIG, 2002). Tem sido relatado que o treinamento moderado é benéfico para saúde. Ele aumenta a sensibilidade periférica à insulina, diminui seus níveis séricos, melhora parâmetros como os níveis de glicemia de jejum e de lipídios plasmáticos, reduz os valores de colesterol e triglicerídeos, abaixa a pressão arterial, acelera o gasto energético, as taxas metabólicas e os parâmetros do estresse oxidativo em animais com SM já estabelecida (Touati *et al.*, 2011; De Farias *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

Exercício diário moderado e exercícios de longa duração (treinamento de resistência) produzem um aumento no conteúdo mitocondrial no músculo. No entanto, exercícios de alta intensidade têm demonstrado dano muscular derivado da elevação da

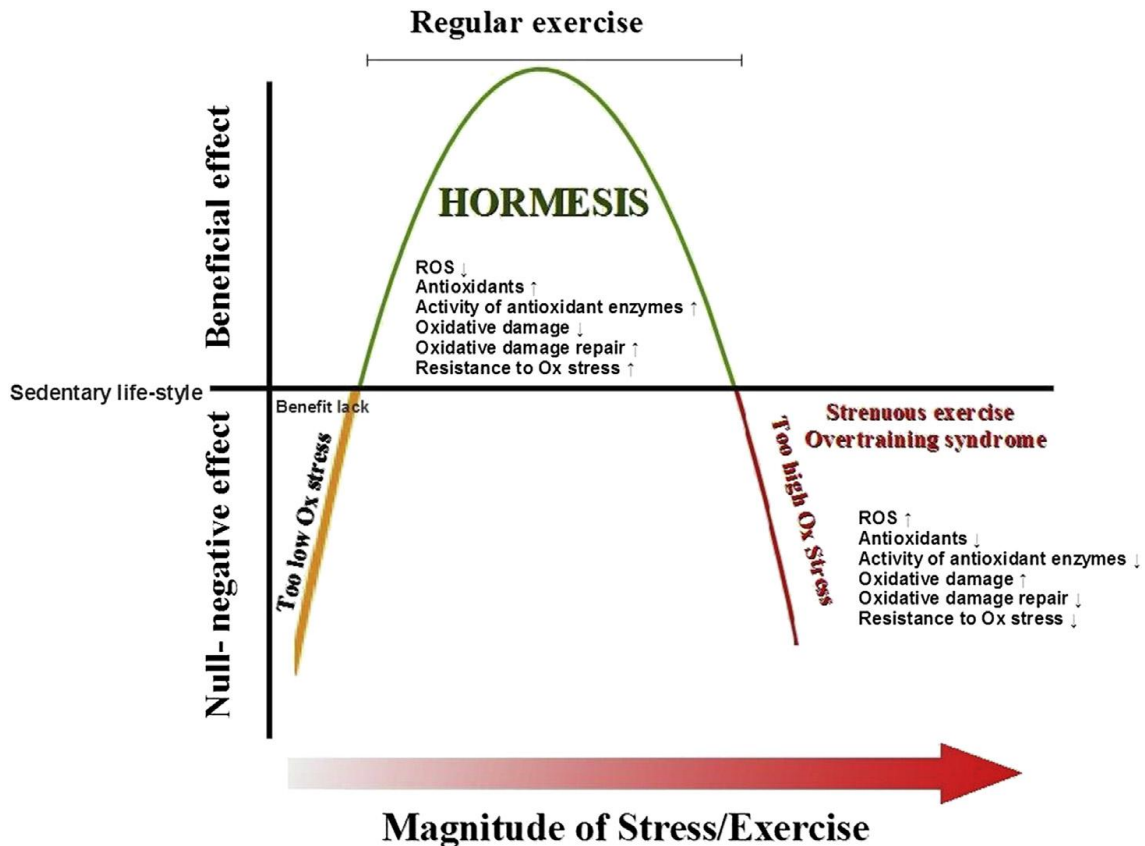
sensibilidade de agentes oxidantes e da liberação de enzimas proteolíticas no músculo e no fígado. Identificou-se, também, a perda na integridade das membranas.

Segundo a Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), recomenda-se atividades aeróbicas de 3 a 5 vezes por semana, com intensidade de 50 a 65% do VO₂ máx. (SBD 40 a 60% do VO₂ máx. ou 50 a 70% da FC máx.) e de 30 a 60 minutos por sessão.

O TF realizado regularmente proporciona uma adaptação na qual há um aumento da atividade das enzimas antioxidantes, a fim de reparar os danos oxidativos (Radak *et al.*, 2008). Sendo assim, o processo de adaptação induzido por EROs durante o treinamento físico cria um sistema que se assemelha a hormesis.

A teoria hormesis afirma que os sistemas biológicos respondem com uma curva em forma de U invertido à exposição a produtos químicos, radiações e toxinas. Hormesis é o fenômeno de dose-resposta caracterizado por uma estimulação em baixas doses e uma inibição de doses elevadas em produtos químicos, radiações e toxinas. (Calabrese e Baldwin, 2003). Nesse caso, a “toxina” durante o exercício é a formação de ERO, que evoca a adaptação específica com o aumento da resistência ao estresse oxidativo, tentando estabelecer a homeostasia (FIGURA 4).

Figura 4 – Hormesis e exercício



O exercício físico regular induz hormesis, reduz o estresse oxidativo, protege contra o aparecimento e progressão da doença, e melhora o desempenho e qualidade de vida. Exercício extenuante e overtraining aumentam o estresse oxidativo e o risco de doenças. No entanto, um estado de estresse oxidativo, que é demasiado baixo leva a uma falta de benefícios relacionados à hormese e pode ser prejudicial para a saúde. Ox, oxidativo; ROS, espécies reativas de oxigênio.

Fonte: (Pingitore *et al.*, 2015).

Adaptações no músculo esquelético ocorrem com a prática do treinamento físico regular, pois há o crescimento da capacidade do músculo e do metabolismo aeróbico e sua resistência à fadiga. Isso provoca um aumento da atividade muscular e, conseqüentemente, induz a biogênese mitocondrial, a transformação do tipo de fibra e a angiogênese. Leva, ainda, à elevação da ERO. O aumento da ERO acontece devido à demanda metabólica que gera a ampliação do consumo de oxigênio, do fluxo sanguíneo e de enzimas da cadeia respiratória, como xantina oxidase e NADPH oxidase. Esse processo contribui para geração de espécie reativa de oxigênio durante o exercício (Pingitore *et al.*, 2015).

A produção de ERO na mitocôndria ocorre por meio dos componentes da cadeia respiratória capazes de converter oxigênio (O_2) em ânion superóxido, quando

reduzido. Na contração muscular, o O_2^- pode ser gerado na cadeia respiratória ou pela NADPH oxidase, que são enzimas ativadas pelo cálcio, ácidos graxos livres; pelas interações proteínas-proteínas, que são doadores de elétrons (Steinbacher e Eckl, 2015); e também pela indução da insulina, que ativa a NADPH oxidase (Espinosa *et al.*, 2009).

Outro mecanismo com capacidade de gerar EROs é da xantina oxidase, no exercício agudo vai ocorrer um aumento na temperatura e da concentração de cálcio e o aumento da ATPase leva enzima chave que catalisa a hidroxilação da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico. No músculo, está presente no citosol e em células endoteliais. A atividade de xantina oxidase aumenta após a contração muscular e leva a peroxidação lipídica, oxidação de proteína e danos no músculo (Judge e Dodd, 2004).

Com o objetivo de reparar esses danos fisiológicos, o organismo aumenta a atividade antioxidante tenta minimizar as EROs e manter a homeostase celular. O treinamento físico moderado aumenta a expressão e a atividade das enzimas antioxidantes e das UCP3.

A UCP3, expressa especificamente no tecido muscular e no TAM, esta relacionada com o controle corporal, sendo regulada pela disponibilidade e metabolismo de substratos energéticos como lipídeos e glicose (Tsuboyama-Kasaoka e Ezaki, 2001). A entrada desses substratos no músculo resulta no aumento de gasto energético (Vidal-Puig *et al.*, 1997).

Nas situações de elevada concentração de ácido graxo e baixa demanda de ATP, a ativação das UCPs seria uma forma de aumentar a oxidação dos ácidos graxos disponíveis, gerando principalmente calor (Boss *et al.*, 2000). O TF causa mudanças na função mitocondrial no sentido de aumentar a capacidade aeróbica de ressíntese de ATP e minimizar a produção de espécies reativas de oxigênio (Tonkonogi *et al.*, 2000).

Estudos mostram que o PPAR γ desempenha importante papel na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos, reduzem os níveis de triglicédeos, melhora a sensibilidade à insulina e normalizando a glicemia e a resistência à insulina em doenças como obesidade e síndrome metabólica.

PPARs são os principais executores de regulação induzida PGC1 α do metabolismo oxidativo. Estresse fisiológico, como o exercício, induz a expressão e a atividade de PGC1 α , o que estimula a produção de energia com a ativação de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e de glicose, ciclo do ácido tricarboxílico, β -oxidação, fosforilação oxidativa e biogênese mitocondrial (Fan e Evans, 2015).

Sendo assim, sugerimos que o treinamento físico poderia beneficiar o estresse oxidativo hepático nos animais com síndrome metabólica já estabelecida por meio da regulação das enzimas antioxidantes, protegendo, assim, o fígado de níveis de EROs deletérios.

2. JUSTIFICATIVA

Nosso estudo teve início com a busca de uma dieta que representasse a dieta ocidentalizada, caracterizada por altos índices de calorias, à base de lipídeos e carboidratos encontrados em *fast food*, refrigerantes e doces. Esse tipo de alimentação pode alterar padrões metabólicos, desencadeando doenças crônicas, como a obesidade e a síndrome metabólica.

Castro (2013) realizou um estudo com ratos *fischer*, no qual utilizou uma dieta rica em frutose (60% frutose) comparando com uma dieta hiperlipídica (30% banha) durante 13 semanas. Além de contrapor as dietas, comparou-se, também, a idade dos animais (4 e 12 semanas). Tais dados mostraram que os ratos jovens (4 semanas) alimentados com uma dieta hiperlipídica (30% banha) desenvolveram alterações metabólicas, acúmulo de gordura no fígado, obesidade visceral, aumento de peso e dislipidemias, assemelhando, assim, às características da SM humana.

Uma dieta rica em gordura é relatada na literatura por causar acúmulo de lipídeos no fígado (esteatose hepática), obesidade e resistência à insulina. Fatores estes que levam à inflamação e à disfunção mitocondrial. É um estado pró-inflamatório que se reflete, de forma generalizada, com alto índice de comorbidades metabólicas e prejudica vários órgãos, por exemplo, o coração, os rins e, em destaque em nosso trabalho, o fígado.

O fígado desempenha papel central no metabolismo de lipídeos, na importação de ácidos graxos livres no soro e na síntese, no armazenamento e na exportação de lipídeos e lipoproteínas. O acúmulo de gordura nas células do fígado, a esteatose, deixa o órgão vulnerável a insultos secundários, como a inflamação. Esse processo leva a uma maior produção de espécies reativas que são lesivas nas células (estresse oxidativo) (Adams *et al.*, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do treinamento físico como tratamento sobre alterações metabólicas hepáticas em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

3.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, pretende-se analisar, em ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica ou padrão e treinados (natação) ou sedentários, os seguintes requisitos:

- pressão arterial e frequência cardíaca, medidas;
- eficiência do treinamento físico;
- parâmetros biométricos e bioquímicos;
- marcadores do estresse oxidativo;
- atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT);
- modificações na expressão gênica da via de sinalização da insulina (IR, IR-1, IR-2, AKT e GLUT-4);
- alterações na expressão gênica PPAR γ ;
- parâmetros histológicos hepáticos.

4 METODOLOGIA

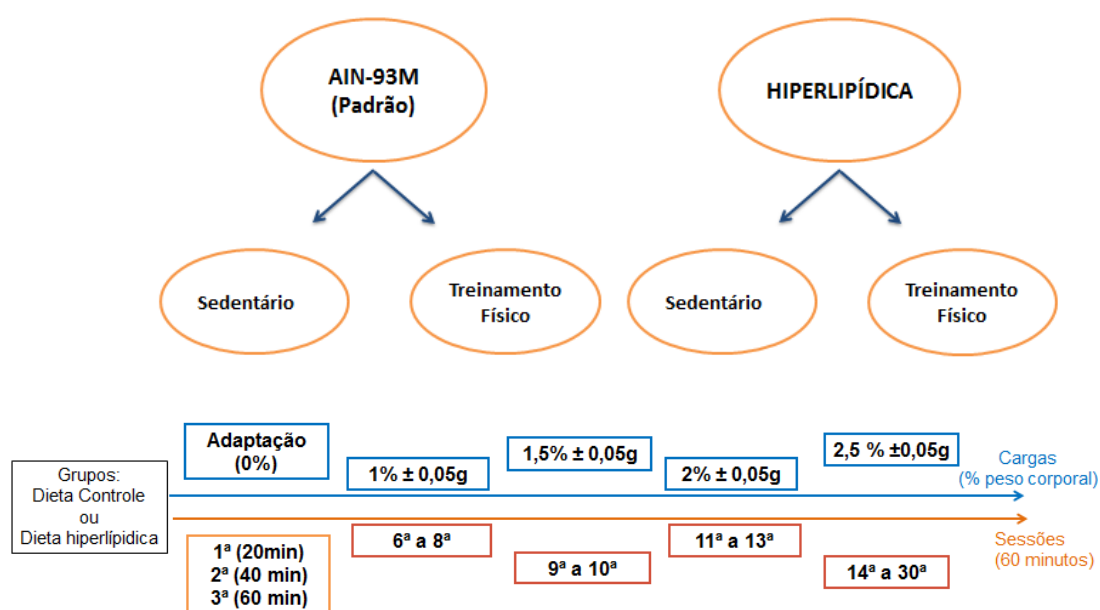
4.1 Animais

Neste estudo, foram utilizados ratos machos *fisher*, recém-desmamados, com quatro semanas de idade (ratos jovens, 40 – 60g), provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental (Labnex) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP, Brasil). Os animais permaneceram em gaiolas individuais e em ciclo claro-escuro 12h – 12h, no Centro de Ciência Animal da Ufop (CCA/UFOP). Durante todo o experimento, os ratos tiveram livre acesso à água e às dietas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Ética em Cuidados de Animais Experimentais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP), nº do protocolo 2011/31.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: 1) Dieta Controle (AIN-93M), 2) Dieta hiperlipídica (30% de banha) até o final do experimento. Após sete semanas de consumo alimentar, eles foram submetidos ao treinamento físico ou ao sedentarismo durante seis semanas. Depois de 13 semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados para coleta, pesagem dos órgãos, análises bioquímicas, avaliações dos parâmetros do estresse oxidativo e da expressão gênica dos parâmetros da via de sinalização da insulina e do PPAR γ . O delineamento experimental está esquematicamente representado a seguir (FIGURA 5):

Figura 5 – Protocolo experimental e treinamento físico natação



Fonte: Elaboração própria.

4.3 Indução da síndrome metabólica

Para a indução da SM, foi substituída a alimentação padrão AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993) por uma dieta hiperlipídica contendo 30% de banha (fornecedor: Pragsoluções). Todos os ratos receberam a alimentação a partir da quarta semana de vida, logo após o desmame, por 13 semanas. Os animais controle foram submetidos à dieta padrão AIN-93M, durante o mesmo período. A composição da dieta hiperlipídica e da dieta padrão estão representadas na Tabela 1 a seguir:

Tabela 3 – Comparação entre dieta controle AIN-93 e hiperlipídica

Dieta controle AIN-93			Dieta Hiperlipídica		
Ingredientes	p/ 1 Kg	Un	Ingredientes	p/ 1 Kg	Un
Amido de milho	465,700	g	Leite condensado	316,000	g
Caseína	140,000	g	Caseína	180,000	g
Amido dextrinizado	155,000	g	Frutose	33,500	g
Sacarose	100,000	g	Sacarose	70,000	g
Óleo de soja	40,000	g	BANHA	300,000	g
Fibra (Cel. Microcrist.)	50,000	g	Fibra (Cel. Microcrist.)	50,000	g
L-cistina	1,800	g	L-cistina	3,000	g
Bit. Colina	2,500	g	Bit. Colina	2,500	g
BHT	0,008	g	BHT	0,000	g
Mix mineral	35,000	g	Mix mineral	35,000	g
Mix vitamínico	10,000	g	Mix vitamínico	10,000	g
Kcal/g	3,80		Kcal/g	5,20	
TOTAL	1000,0		TOTAL	1000,0	

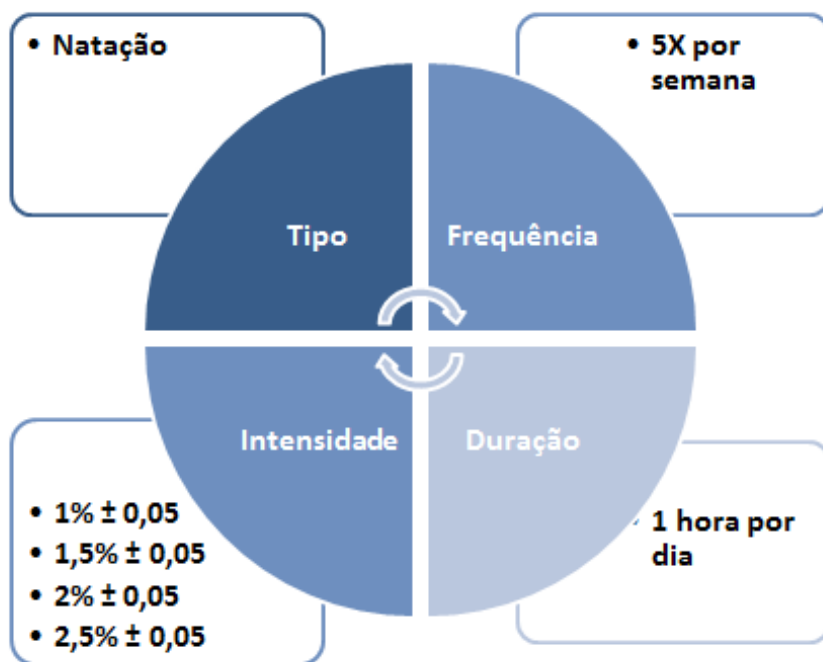
4.4 Treinamento físico

O treinamento físico (TF) foi aplicado cinco vezes por semana, durante seis semanas, começando a partir da sétima semana de implementação da dieta (10 semanas de vida). As sessões foram realizadas em tanques coletivos (12-15 ratos por tanque) com a água na temperatura de $31 \pm 2^\circ\text{C}$, mantida por um termostato.

Na primeira sessão de TF, os grupos foram submetidos a 20 minutos de natação; na segunda sessão, 40 minutos; e da terceira sessão em diante, os animais nadaram 60 minutos. Na semana inicial, eles não utilizaram sobrecarga. A partir da segunda semana, teve início o TF com sobrecarga. As sobrecargas foram obtidas com a fixação de porcas e/ou arruelas, por meio de gomas elásticas, à porção proximal da cauda do animal. Para efeito adaptativo, da sexta à oitava sessão, os animais realizaram o TF com sobrecarga de $1\% \pm 0,05\text{g}$ de sua massa corporal. Na nona e na décima sessões, foi empregada uma carga de $1,5\% \pm 0,05\text{g}$. Da 11^a a 13^a sessões, a carga foi de $2\% \pm 0,05\text{g}$ da massa corporal. A partir da 14^a sessão de TF foi utilizada uma sobrecarga de $2,5\% \pm 0,05\text{g}$ da massa corporal. Devido às possíveis alterações na massa corporal dos animais ao longo do TF, foram feitas manutenções da sobrecarga a cada três sessões.

O grupo de ratos sedentários foram colocados em baldes coletivos (4 por balde), com água rasa ($\pm 15\text{cm}$ de altura), para que fossem expostos às condições semelhantes dos demais grupos. Na primeira sessão de exposição ao meio líquido, os ratos SD permaneceram no balde por 20 minutos; a partir da segunda sessão, os animais ficaram expostos ao meio líquido por 40 minutos.

Figura 6 – Treinamento físico



Fonte: Elaboração própria.

4.5 Avaliação indireta da pressão arterial média por meio da pletismografia de cauda

A avaliação indireta da pressão arterial média por pletismografia de cauda foi realizada na 7^a e na 13^a semanas do experimento nos grupos dieta padrão e dieta hiperlipídica treinados e sedentários.

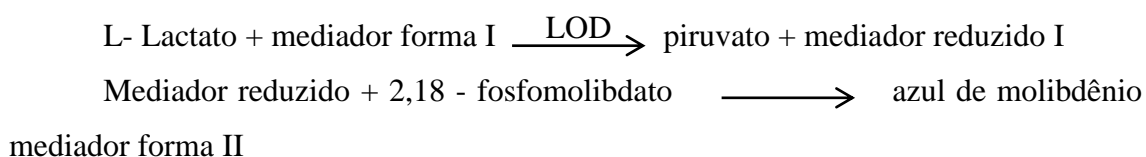
Os animais foram colocados em um sistema de contenção para ratos (LE 5022, Panlab) e permaneceram em uma caixa de aquecimento (LE 5610, Panlab) para facilitar as medidas de PA. Nesse sistema de contenção, somente a cauda do animal ficou mantida exteriorizada, onde foi acoplado um manguito de borracha e um transutor (LE 5160-R, Panlab) para registro da PA e FC. Cerca de cinco mensurações foram realizadas em cada animal, e a média foi utilizada nas análises dos resultados.

4.6 Avaliação do lactato sanguíneo

Para avaliar o condicionamento físico dos animais submetido à dieta padrão e hiperlipídica, após o protocolo de treinamento físico, mensurou-se o lactato sanguíneo, por meio do teste de lactato pelo método de tiras testes e analisador

Accutrend® Lactate (Roche), conforme instruções do fabricante e de acordo com (Soares *et al.*, 2011).

O princípio do teste baseou-se na aplicação da amostra de sangue na zona reativa da tira. O sangue passa através de uma rede protetora até uma camada de vidro, onde os eritrócitos ficam retidos, de modo que apenas o plasma sanguíneo penetre na zona de detecção. O lactato é determinado por um fotômetro de reflexão pela reação colorimétrica do medidor lactato-oxidase (LOD) e um comprimento de onda de 657nm:



A fim de verificar o efeito do treinamento físico nos grupos dieta padrão e dieta hiperlipídica treinado, foi realizado o teste de lactato 48 horas após a última sessão de treinamento físico ou a exposição à água rasa dos grupos dieta padrão e dieta hiperlipídica sedentários. Todos os animais foram submetidos a uma única série de natação por 30 minutos com sobrecarga de 2,5% do peso corporal. Foi feita coleta de sangue imediatamente após a sessão de treinamento físico para dosagem do lactato.

4.7 Coleta dos tecidos e órgãos

Ao final das 13 semanas de dieta e seis de treinamento físico, os animais foram pesados. Após a eutanásia, os tecidos foram retirados; os órgãos, pesados e armazenados no freezer -80° para posteriores avaliações. Para análise dos dados, utilizou-se os pesos relativos dos tecidos.

4.8 Análises bioquímicas

Ao final das dietas e das seis semanas de treinamento físico, os animais foram submetidos ao jejum noturno e tiveram amostras de sangue (2 a 3ml) coletadas; depois ocorreu a eutanásia. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (4000 rpm; 4°C; 6 min) para a separação do plasma com vistas à dosagem da glicose de jejum (sangue tratado com anticoagulante *Glistab*, EDTA e fluoreto de potássio) ou soro para

dosagens de colesterol total, albumina, tansaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Plasma e soro foram aliquotados e guardados a -80°C para realização das análises bioquímicas. Os testes foram executados por meio de kits comerciais individuais (Labtest, Lagoa Santa - MG, Brasil) fornecidos pelo Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (Lapac/Ufop).

Preparação do tecido hepático

A coleta do tecido hepático foi realizada imediatamente após a eutanásia dos animais. Para determinar concentrações de proteína carbonilada, 200 mg de tecido foi homogeneizado em 50 mM de tampão de fosfato (pH 6,7) e EDTA 1 mM. Para determinar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade da CAT e SOD, 100 mg de tecido de fígado foi homogeneizado em tampão de fosfato (pH 7,4). Do mesmo modo, para determinar a concentração total de glutathione, 100 mg de tecido de fígado foi homogeneizado em 5% de tampão sulfossalicílico. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como a amostra biológica.

4.9 Proteínas totais

Foi utilizado o protocolo de proteínas totais pelo método de (Lowry *et al.*, 1951). O tratamento dos dados foi feito pela curva padrão criada no programa *Microsoft Excel*®, com uma tabela relacionando a concentração dos padrões e o valor da absorbância lida no espectrofotômetro FEMTO 700 S. O protocolo consiste na dosagem de proteínas totais de tecidos, que é comparada à dosagem de espécie reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteína carbonilada, complexo glutathione, superóxido dismutase e catalase.

O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteu, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul. Inicialmente foram preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

- Reagente A: dissolve-se 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em

100 mL de água destilada. A solução deve ser armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.

- Reagente B: dissolve-se 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250 mL de água destilada. Deve ser armazenada a temperatura ambiente.

- Reagente C: adiciona-se 1 mL do reagente A em 50mL do reagente B. Deve ser preparado na hora do teste.

- Reagente D: dissolve-se 1 mL de Folin-Ciocateau em 1mL de água destilada.

Deve ser preparado na hora do teste. Em seguida foram realizados quatro pontos para a construção da curva padrão para proteínas totais, pelo seguinte procedimento:

P1- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 0,2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,05mg/mL.

P2- 7,5 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,15mg/mL.

P3- 15 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,30mg/mL.

P4- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,5mg/mL.

Para a realização da dosagem, foram adicionados 10 μ L de amostra ou padrão em tubos de polipropileno e completados para 100 μ L com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100 μ L de água destilada.

Posteriormente adicionou-se 1 mL do reagente C em todos os tubos (incluindo branco e padrões). A mistura foi agitada no vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi adicionado em cada tubo 100 μ L do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 660nm. Após as leituras, foi feito um

gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) versus absorvância do padrão (Eixo X). A equação da reta gerada foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

4.10 Atividade superóxido dismutase

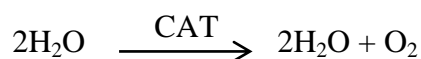
A SOD é uma enzima responsável por converter espécie reativa de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), em moléculas menos ativas e substâncias sintetizadas endogenamente.



A atividade enzimática foi determinada em leitor de Elisa em 570nm (Dieterich *et al.*, 2000), baseado na capacidade da enzima em catalisar a reação do superóxido O_2^- e do peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol.

4.11 Atividade da enzima catalase

A CAT é uma enzima presente na maioria dos organismos aeróbios e é responsável pela conversão do H_2O_2 intracelular em água e oxigênio.



A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o H_2O_2 em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi (1984). Resumidamente, um fragmento de 100 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 100mM, (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno foram adicionados 50 μ L de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 μ L de água destilada e 10 μ L da amostra. A reação foi iniciada pela adição de 900 μ L de H_2O_2 (5 mM). As absorvâncias foram determinadas a cada minuto, durante três

minutos, a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco. Uma unidade (U) de catalase é equivalente à hidrólise de 1mol de H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em $\mu\text{mol}/\text{mL}$ de amostra. A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer. A absorvância utilizada para o cálculo é o delta obtido das três absorvâncias lidas (absorvância final – absorvância inicial).

4.12 Glutathiona total

A glutathiona está presente nas células, principalmente, na sua forma reduzida (GSH), representando em torno de 90%; o restante aparece na forma oxidada (GSSG). Foi utilizado um método cinético para mensurar os níveis de glutathiona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, por meio da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) em TNB.

Para a dosagem, uma amostra de 100mg de tecido hepático foi homogeneizada com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA). Em seguida, foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

A dosagem foi realizada em microplaca de 96 poços. Inicialmente, foram adicionados aos poços 150 μL da mistura de trabalho que contém GR, DTNB, e 100mM tampão fosfato de potássio. Adicionou-se 10 μL de amostra para os testes e 10 μL de 100 mM tampão fosfato de potássio para o branco. As amostras foram incubadas por 5 minutos; e, depois, a reação foi iniciada com a adição de 50 μL de solução de NADPH. Com o início da reação, a absorvância foi imediatamente medida a 405nm, utilizando-se um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas seis leituras com intervalo de 1 minuto entre cada uma.

Para mensurar os níveis de GSSG, o procedimento foi o mesmo; porém, a amostra biológica passou por um processo de derivatização antes do início da dosagem. Para isso, foi feito uma alíquota de 100 μL de amostra e se acrescentou 2 μL de vinilpiridina e 3 μL de TEA. A nova amostra tinha o pH entre 6 e 7 e ficou incubada por uma hora. Após esse período, utilizou-se 10 μL dessa nova amostra para reagir com a mistura de trabalho, conforme anteriormente descrito.

As concentrações de glutathiona total e oxidada foram obtidas através de uma curva padrão realizadas para cada uma das dosagens. A subtração da concentração de

glutathiona oxidada do valor da concentração da glutathiona total forneceu o valor da concentração da glutathiona reduzida.

4.13 Ácido tiobarbitúrico

Este protocolo consiste na dosagem de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico para análise do dano oxidativo ao tecido. Para tal, foi determinado, por meio do ensaio de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico, utilizando o método de Draper (Draper *et al.*, 1993). Esse método se baseia na capacidade de o ácido tiobarbitúrico se ligar aos lipídeos oxidados.

Para realizar a dosagem, 100 mg do tecido hepático foram homogeneizados com 1 mL de tampão Tris HCl 20 mM (pH 7,4) e em seguida o homogenato foi centrifugado a 10000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo foi adicionado o volume de 500µL de homogenato, 250µL de ácido TCA a 28% dissolvido em HCl a 0,25N, 250µL de TBA a 1% dissolvido em ácido acético 1:1, e 125µL de butil-hidroxi-tolueno (BHT) 5mM dissolvido em etanol. Este tubo foi agitado no vórtex e colocado em um banho maria a 95°C por 15 minutos. Após este tempo, os tubos foram imediatamente colocados em um banho de gelo, em seguida agitados e levados à centrifugação a 10000g por 15 minutos a 4°C. A absorbância do sobrenadante obtido foi determinada a 535 nm em espectrofotômetro zerado com água destilada (branco). Os resultados foram expressos em U/ml/mg proteína.

4.14 Proteína carbonilada

A reação de espécies reativas de oxigênio com proteínas pode levar à sua oxidação com a consequente formação de derivados carbonílicos, capazes de serem mensurados por métodos sensíveis. Para determinar concentração de proteína carbonilada, utilizamos o método baseado no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteína, como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina), para produzir o grupo carbonil. Para realização da dosagem, amostra de 400 mg de tecido hepático foi homogeneizada em 2 mL de tampão fosfato 50 mM, (pH 6,7) e em seguida o homogenato foi centrifugado a 10000g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado no procedimento experimental. O volume de 500 µL do

sobrenadante do homogenato foi transferido para dois tubos de polipropileno denominados, Amostra (A) e Controle (C). A cada tubo foi adicionado igual volume de ácido tricloroacético (TCA) 10% e após centrifugação a 5000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados ao tubo A 500 µL de DNPH 10 mM em 2 M de ácido clorídrico (HCl), e ao tubo C 500 µL de HCL 2 M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos sofrendo agitação a cada 15 minutos. No passo seguinte foram adicionados 500 µL de TCA 10% em cada tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram novamente descartados. Os precipitados em ambos os tubos foram lavados com 1 mL da mistura etanol/acetato de etila, na proporção de 1:1, misturados no vórtex e novamente centrifugados conforme descrito na etapa anterior, o sobrenadante foi descartado. Este último passo foi repetido duas vezes. Ao final do processo de lavagem, foram adicionados em ambos os tubos 1 mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10000 g por 10 minutos à 4°C. Finalmente as absorbâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 370 nm. Os resultados foram expressos em nmol de proteína carbonilada por mg de proteína.

Este pode ser medido pela reação com 2,4-dinilhidrazina. O conteúdo de carbonil foi determinado por um coeficiente 22.0000 Molar⁻¹ em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine *et al.* (1990; 1994).

4.15 Expressão do mRNA de componentes da via de sinalização da insulina no fígado

O qRT-PCR (*real-time reverse transcription polymerase chain reaction*) foi realizado em grupos diferentes de ratos. Para análise quantitativa da expressão do mRNA, o fígado foi rapidamente removido e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido; em seguida, estocado em freezer a -80°C até ser processado.

O tecido foi homogeneizado com 1mL de TRIzol Reagent (Sigma), depois, deixado em repouso *overnight* a 4°C na geladeira, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. No outro dia, as amostras foram retiradas e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 400µl de clorofórmio, específico para biologia molecular (Sigma). Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto. Após, foram incubadas por 25 minutos a temperatura ambiente,

centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos a 4°C (*Vision – Micro high seed refrigerated cetrifugue*) e separadas na fase superior que continha o RNA.

Então, as amostras foram transferidas da fase aquosa para outro *ependorff*, ao qual foi adicionado 600µl de etanol 95%, e inverdido o tubo três vezes. Logo após, foi transferido 600µl do conteúdo para a coluna, homogeneizado e centrifugado a 14.000rpm por 2 minutos. O etanol foi descartado da parte inferior da coluna, lavou-se novamente com etanol 95%. Após, adicionou-se 600µl de RNA WASH SOLUTIONS, a mistura foi centrifugada a 14.000rpm por 2 minutos. Em seguida, o RNA foi tratado com DNase conforme instruções do fabricante.

Em cada amostra, foi adicionado 50µl de DNase na membrana da coluna. A seguir, as amostras foram incubadas por 25 minutos em temperatura ambiente. Após, foi adicionado 600µl de RNA WASH SOLUTIONS centrifugado (2min, 14000 rpm) e 250µl do mesmo, que também foi centrifugado. A coluna foi transferida para um *ependorff* e foi adicionado 100µl de RNA FREE WATER centrifugado (2min, 14000 rpm). Descartou-se a coluna, pois o RNA já havia descido para o *ependorff* e foi colocado em gelo por 15 minutos até o momento da leitura no aparelho NANOVOUR, que avalia a pureza e a integridade do RNA.

Foi colocado em outro *ependorff* 20µl da amostra, 2,5µl do tampão da amostra e 7,5µl de formamida. Foi desnaturado durante 5 minutos a 65°C e, logo depois, colocado no gelo durante 5 minutos. As amostras foram aplicadas no gel de agarose 1,2% e correram em uma cuba de eletroforese a 90V, 50mA, durante 40 minutos. Ao final, o gel foi revelado, e foram observadas as bandas 18s e 28s.

Para avaliar a pureza, foi feita a leitura no espectrofotômetro (NONADROP 2000), no qual foi coletada a concentração e as razões A280/260 e A260/230 e a integridade do RNA foram avaliadas através do gel de agarose. Valores da razão abaixo de 1,8 indicaram, respectivamente, contaminação por proteínas e por compostos fenólicos; por isso, foram desconsiderados.

Após a leitura, foi realizada a síntese do cDNA, adicionando 1µg do RNA e a nuclease *free water* (água do kit); no final, colocou-se 10µl do Mix da reação que contém: 10X RT Buffer; 25X dNTP mix (100mM); 10X RT Randon primer; Multi Scribe™RT; RNase Inhibitor e Nuclease Free Water. Foi posto no gelo até programar o termociclador, que deve ter esta sequência de tempo e temperatura:

- 25°C – 10 minutos;
- 37°C – 60 minutos;
- 37°C – 60 minutos;
- 85°C – 5 minutos;
- 4°C – tempo indeterminado.

Após o uso do termociclador, já está pronto o cDNA, e as amostras são guardadas imediatamente no *freezer* a -80°C. No dia em que foi utilizado o cDNA, foi adicionado 180µl de água (do kit) para diluir 10 vezes.

Para esses ensaios, foram preparadas soluções contendo os *primers* cujas sequências estão na Tabela 2.

Tabela 4 – Sequências de *primers* usados na análise de qRT-PCR

Gene	Accession number (RGD ID)	Primer sequence (5'- 3')
Rn18s	5687330	F GTAAGTGCGGGTCATAAG R CCATCCAATCGGTAGTAGC
Insr	2917	F CCTTGGATCGTTCCTCTCAC R GGTCCGTTTGATGCTCAGAG
Irs-1	2922	F TGAGAGCGGTGGTGGTAAGC R GGGCTGCTGGTGTGGAATC
Irs-2	69316	F GCAGGACTTCCAGTGAACG R GCCACACCACATTCGCATG
AKT-2	2082	F GGAGGTCATGGAGCATCGGTTC R GTTTGAAGGGTGGCAGGAGC
Slc2a4	2711	F GGTGCCTTGGGAACACTCAAC R TGCAGGAGAGCAGGGAGTACTG
Pparg	3371	F CGTGAAGCCCATCGAGGACATC R TCTGGAGCACCTTGGCGAACAG

Os cDNAs dos genes dos receptores da insulina, AKT-2, GLUT- 4, PPAR γ e o constitutivo 18s foram amplificados usando os *primers* especificados na Tabela 2 e o SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando 1µg de RNA total extraído e o kit High Capacity RT-PCR System (Applied Biosystems), seguindo a recomendação do fabricante.

Para cada 1µg de RNA total, foram utilizados 2µL de *primers* randômicos (10 x RT Buffer), 0,8 de dNTPs [25x dNTP mix (100 µM)], 1µL de transcriptase reversa (*Multi scribe reverse transcriptase*) e H₂O livre de RNase para um volume final de 10µL. Essa preparação foi adicionada ao RNA (1µg) e foi mantida no gelo até a programação do termociclador (*Biocycler, version 3.2*). A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos; seguidos de 120 minutos a temperatura de 37°C. 85°C por 5 minutos; e finalmente, 4°C por tempo indeterminado. A amostra foi estocada a -80°C.

Para análise da expressão dos genes em estudo, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. As reações foram realizadas pelo kit *SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)* em placas de 96 poços (*MicroAmp[®] Optical 96 Well Reaction Plate - Applied Biosystems*) e seladas com adesivo óptico (*MicroAmp[®] Optical Adhesive Film - Applied Biosystems*) ao final do experimento. Foram pipetados 3µL de *primer* liofilizado (na concentração de 2,5µM) e 7µL de mix de reação contendo 2 µL de cDNA diluído 5 vezes com água livre de DNase e 5µL de *SYBR[®] Green PCR Master Mix*, totalizando um volume de 10µL de reação em cada poço.

Os ensaios foram realizados em triplicata biológica para todos os genes avaliados, com o gene de referência (rRNA 18S) presente em todas as placas. Os valores de *baseline* foram ajustados para 3-15 ciclos. O *threshold* foi ajustado à região associada ao crescimento exponencial do produto da PCR e, portanto, fixado em 0,2 para todas as amostras, uma vez que se comparou o mesmo gene em diferentes grupos.

As análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão gênica (Cq comparativo ou $\Delta\Delta Cq$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um alvo específico entre as amostras. Os níveis dos genes foram normalizados pelos níveis do gene de referência (rRNA 18S), e uma amostra calibradora (CT-Sed) foi utilizada como base para resultados de expressão comparativa. O calibrador foi considerado uma amostra 1x, e todas as outras quantidades foram expressas como uma diferença n-vezes em relação a ele. Os resultados foram alcançados por uma fórmula aritmética que considera a quantidade do alvo, normalizado para o gene de referência em relação ao clibrador, dada por $2^{\Delta\Delta Cq}$.

A reação de qRT-PCR foi conduzida conforme programação contida no aparelho ABI 7300 *Applied Biosystems*.

4.16 Curva de eficiência e amplificação dos *primers*

Para determinar as eficiências da amplificação dos genes alvos e dos genes de referência, foram construídas curvas padrões para cada *amplicon* com base em uma mesma amostra. O ensaio foi realizado em triplicata. A curva padrão foi representada por um gráfico de regressão linear semi-log do valor de C_q (eixo Y) em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucleico (eixo X). O *slope* da curva padrão foi usado para estimar a eficiência de amplificação.

Uma reação 100% eficiente produz um aumento de 10 vezes no amplicon da PCR a cada 3,322 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_2 10 = 3,3219$). Ou seja, o *amplicon* dobra em quantidade durante a fase geométrica. O cálculo da estimativa da eficiência foi obtido pela fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Os *primers* foram considerados para avaliar a expressão gênica pelo SYBR[®] Green quando apresentaram eficiência de reação acima de 80% e abaixo de 120%.

4.17 Análise histológica

Fragmentos ($\pm 4\text{mm}$) do fígado foram fixados em solução de formalina tamponada 10%. Após 96 horas, os fragmentos foram desidratados, diafanizados, embebidos (processador histotécnico OMA metalúrgica) e emblocados em parafina. Secções parafinadas em microtomia (4 μm de espessura) foram fixadas em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas por Hematoxilina e Eosina (H&E) para avaliações morfológicas gerais e quantificação das lesões inflamatórias.

Fotos representativas dos grupos estudados foram obtidas utilizando-se o microscópio Leica BM5000 com câmera digital (Leica DFC 300 FX) acoplada, com módulo RGB ativado, e associada ao *software* de captura de imagens *Leica Application Suite* em objetiva microscópica de 40 vezes de aumento.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Todos os dados foram submetidos a um teste de normalidade. Para análise dos dados, realizou-se *Anova One-way*, seguido de teste Bonferroni e teste *t student* não pareado, utilizando o programa PRISMA - Graphpad Prism (versão 5.00). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização de distúrbios da síndrome metabólica

Os valores da pressão arterial média e da frequência cardíaca, apresentados na Tabela 3, foram avaliados por pletismografia de cauda após serem submetidos às dietas hiperlipídica ou padrão na sétima semana de dieta. Foi avaliada também a massa corporal dos animais submetidos a essas dietas (hiperlipídica ou padrão). Observou-se um aumento ($p > 0,05$) nos valores de pressão arterial média, frequência cardíaca e no peso corporal dos ratos submetidos à dieta hiperlipídica em comparação aos animais submetidos à dieta padrão. Os dados sugerem que os animais submetidos à dieta hiperlipídica tiveram distúrbios característicos da síndrome metabólica.

Tabela 3 – Valores da pressão arterial média (mmHg), frequência cardíaca (bpm) mensuradas por meio da pletismografia de cauda e peso corporal (g) na 7ª semana após o início das dietas hiperlipídica ou padrão

	Dieta padrão	Dieta hiperlipídica
PAM (mmHg)	119±6,2	134±2,4*
FC (BPM)	367±12,5	454±8,5*
Peso (g)	193±6,1	276±4,6*
N	8-10	8-12

Observação: Dietas hiperlipídica (30% de banha) ou padrão (AIN-93). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo dieta padrão (teste *t student* não pareado).

6.2 Massa corporal e peso dos órgãos

Para avaliar o efeito das dietas (hiperlipídica ou dieta padrão) e do treinamento físico ou sedentarismo, avaliamos o peso corporal dos animais, o peso do fígado e do tecido adiposo retroperitoneal (TABELA 4). O peso corporal dos animais submetidos à dieta hiperlipídica SED foi maior ($p < 0,05$) quando comparado aos submetidos à dieta padrão SED. Os animais alimentados com dieta hiperlipídica TF apresentaram peso corporal similar ($p > 0,05$) em relação aos animais que receberam dieta padrão SED.

Além disso, os animais que receberam dieta hiperlipídica SED tiveram um aumento ($p < 0,05$) no depósito de gordura retroperitoneal quando comparados com os

animais dieta padrão SED. O treinamento físico diminuiu ($p < 0,05$) o depósito de gordura nos animais dieta hiperlipídica TF em comparação aos animais que receberam dieta hiperlipídica SED. Não foram observadas diferenças significativas no peso relativo do fígado entre todos os grupos experimentais.

Tabela 4 – Parâmetros biométricos de ratos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta padrão e submetidos ao treinamento físico ou sedentários

Parâmetros Biométricos	Dieta padrão		Dieta hiperlipídica	
	SED	TF	SED	TF
Fígado (g/100g de peso do rato)	3,1±0,14	3,0±0,11	3,1±0,15	3,6±0,15
TAB retroperitoneal (g/100g de peso do rato)	3,64±0,1	1,99±0,2	5,5±0,7*	3,3 ±0,2 [#]
Peso corporal (g)	321±8,0	341±10	384±15*	310±5,4 [#]
N	5	5	6	6

Observação: Ratos *fischer* alimentados com dieta hiperlipídica (30% de banha) ou dieta padrão (AIN-93), durante 13 semanas, e submetidos ao treinamento físico (TF) ou mantidos sedentários (SED), nas últimas seis semanas de dieta. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo dieta padrão SED. [#] $p < 0,05$ em comparação ao grupo dieta hiperlipídica SED. (Anova *One-Way*, seguido do pós-teste Bonferroni).

6.3 Avaliações bioquímicas, cardiovasculares e de condicionamento físico

Com o objetivo de avaliar o efeito do treinamento físico e das dietas (hiperlipídica e padrão) sobre os parâmetros bioquímicas, foram mensurados os níveis de colesterol total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), albumina, glicemia e insulina, além dos parâmetros cardiovasculares e do condicionamento físico de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica.

A Tabela 5 mostra que os ratos que receberam dieta hiperlipídica SED apresentaram aumento ($p < 0,05$) de colesterol, da ALT, da glicemia e da insulina em comparação aos ratos dieta padrão SED. Os ratos submetidos à dieta hiperlipídica TF tiveram aumento ($p < 0,05$) da ALT em relação aos submetidos à dieta padrão e similar ($p > 0,05$) em comparação aos ratos submetidos à dieta hiperlipídica SED. No entanto, os níveis de insulina nos ratos com ingestão da dieta hiperlipídica TF foi menor ($p < 0,05$) em relação aos submetidos à dieta hiperlipídica SED e similar ($p < 0,05$) em relação aos submetidos à dieta padrão SED. Já os níveis de colesterol total e glicemia nos ratos

submetidos à dieta hiperlipídica e ao TF foram similares ($p>0,05$) em relação aos animais que receberam dieta padrão SED.

Os animais que receberam dieta hiperlipídica SED apresentaram aumento ($p>0,05$) nos valores de PAM e da FC em comparação aos submetidos à dieta padrão. Os valores de pressão arterial média nos ratos que receberam dieta hiperlipídica TF foram menores ($p<0,05$) em relação aos ratos que receberam dieta hiperlipídica e iguais ($p>0,05$) em relação aos ratos que receberam dieta padrão.

Avaliamos, também, a eficiência do treinamento físico em melhorar o condicionamento físico por meio da dosagem de lactato sanguíneo. Os resultados mostraram que os animais submetidos à dieta hiperlipídica SED tiveram níveis de lactato maiores ($p<0,05$) em comparação aos ratos submetidos à dieta padrão SED, indicando que a dieta piorou o condicionamento físico. Porém, o treinamento físico foi eficiente em restaurar o condicionamento físico nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Os níveis de lactato nos ratos dieta hiperlipídica TF foram menores ($p<0,05$) em relação aos ratos dieta hiperlipídica e iguais ($p>0,05$) em relação aos ratos submetidos à dieta padrão.

Tabela 5 – Parâmetros bioquímicos e cardiovasculares de ratos alimentados com dieta hiperlipídica ou dieta padrão e submetidos ao treinamento físico ou sedentários

Parâmetros Bioquímicos e Cardiovasculares	Dieta padrão		Dieta hiperlipídica	
	SED	TF	SED	TF
Colesterol Total (mmol/L)	1,7±0,02	1,6±0,08	2,0±0,02*	1,8±0,06
ALT (U/L)	54,2±1,1	62,4±3,1	68,2±3,3*	70,0±3,4*
AST (U/L)	8,1±2,2	14,9±4,3	5,3±1,8	11,1±3,1
Albumina (µmol/L)	4,1±0,1	4,1±0,06	4,1±0,08	4,06±0,09
Glicemia (mmol/L)	6,1±0,2	6,4±0,3	7,2±0,1*	6,6±0,1
Insulina (ng/ml)	1,3±0,1	1,5±0,2	2,3±0,1*	1,4±0,1 [#]
PAM (mmHg)	111±8,5	125 ±5,2	147±5,7*	107 ±11,7 [#]
FC (BPM)	362±10,3	337±27,5	444±5,6*	384±4,6 [#]
Lactato (mmol/l)	9,42±1,2	10,1±2,3	16,8±0,9*	8,02±0,2 [#]
N	4-6	4-6	4-6	4-6

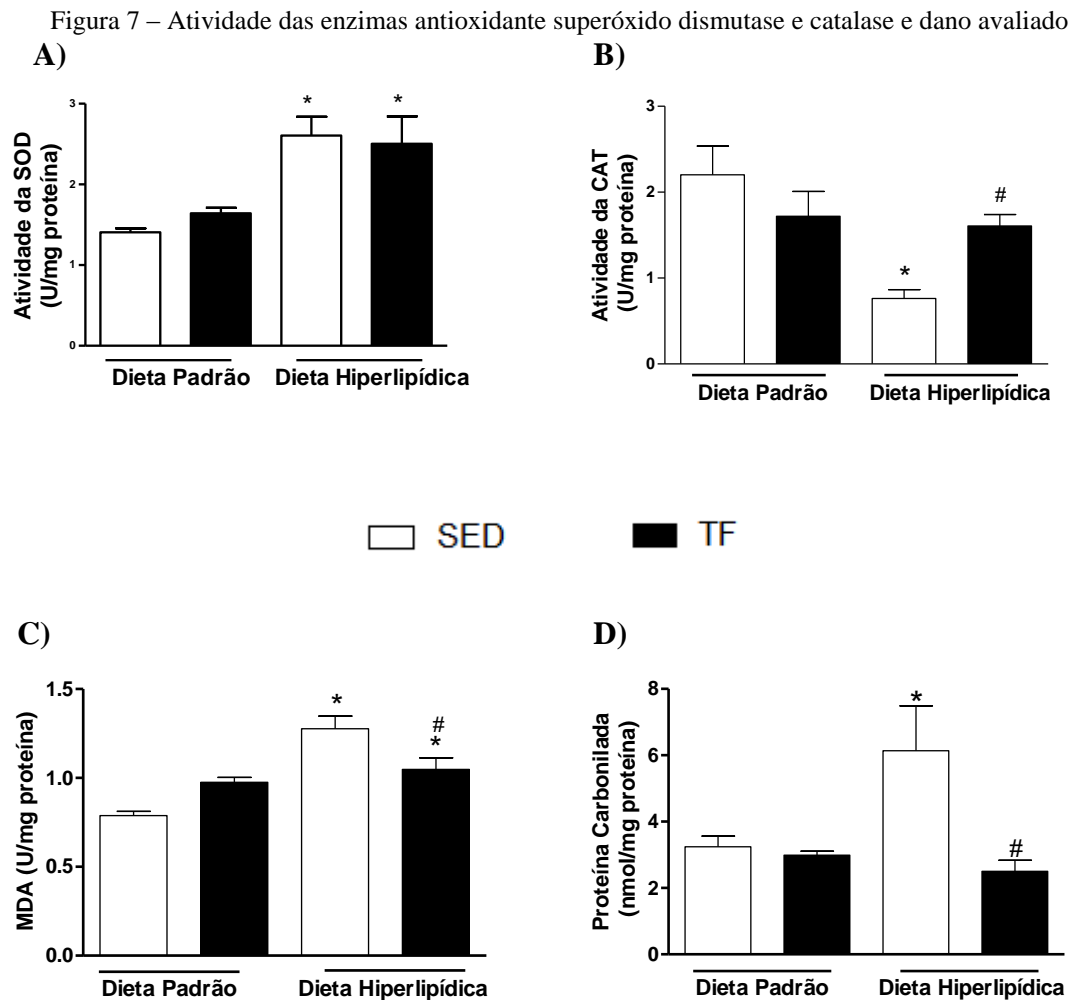
Observação: Ratos *fischer* alimentados com dieta hiperlipídica (30% de banha) ou dieta padrão (AIN-93), por 13 semanas, e submetidos ao treinamento físico (TF) ou mantidos sedentários (SED), durante as últimas seis semanas de dieta. ALT= alanina aminotransferase; AST= aspartato aminotransferase. *p<0,05 em comparação ao grupo dieta padrão SED. [#]p<0,05 em comparação ao grupo dieta hiperlipídica SED. (Anova *One-Way*, seguido do pós-teste Bonferroni).

6.4 Atividade das enzimas antioxidante superóxido dismutase e catalase e dano avaliado pela peroxidação lipídica e pela proteína carbonilada no fígado

A Figura 7 representa a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD; Painel A), catalase (CAT; Painel B) e o dano oxidativo por meio dos níveis relativos de malondialdeído (MDA, método TBARS; Painel C) e da proteína carbonilada (Painel D), no fígado de ratos que receberam dieta (hiperlipídica ou padrão) e foram submetidos ao treinamento físico ou mantidos sedentários. Os resultados apontam que houve um aumento (p<0,05) na atividade da SOD, no dano oxidativo (TBARS) e na proteína carbonilada, além de uma redução (p<0,05) na atividade da catalase nos animais submetidos à dieta hiperlipídica SED se comparados aos animais dieta padrão SED.

O tratamento com o treinamento físico nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica TF aumentou a atividade da catalase e reduziu (p<0,05) o dano oxidativo,

reduzindo (TBARS) a proteína carbonilada em comparação aos animais da dieta hiperlipídica SED. No entanto, a atividade da SOD nos animais dieta hiperlipídica e TF foi maior ($p < 0.05$) se comparada aos animais dieta padrão SED e similar ($p > 0.05$) aos ratos submetidos à dieta hiperlipídica SED.



Legenda: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, U/mg, $n=5-6$; Painel A), atividade da enzima catalase (CAT, U/mg proteína, $n=9-13$; Painel B), níveis de malondialdeído (MDA, U/mg proteína, $n=5-10$) pelo método de TBARS (Painel C) e proteína carbonilada (nmol/mg, $n=6$; Painel D) no fígado de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (30% de banha) ou dieta padrão (AIN-93) durante 13 semanas e submetidos ao treinamento físico (TF) ou mantidos sedentários (SED) durante as últimas seis semanas de dieta. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo dieta padrão SED. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo dieta hiperlipídica SED. (Anova *One-Way*, seguido do pós-teste Bonferroni).

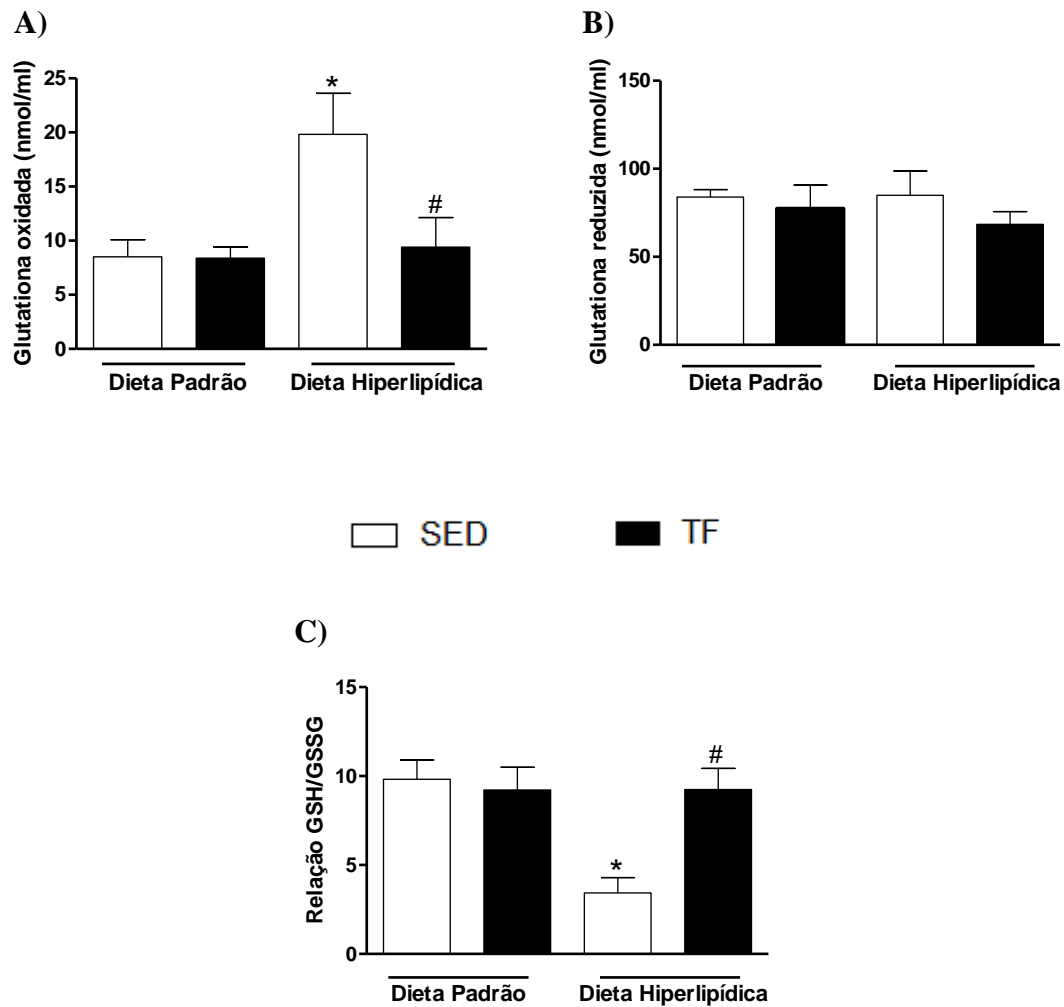
6.5 Complexo glutaciona no fígado

Com o objetivo de verificar o complexo glutaciona no fígado de ratos que receberam dietas (hiperlipídica ou padrão) e foram submetidos ao treinamento físico ou

mantidos sedentário, foram avaliadas a glutathione oxidada (Painel A), a glutathione reduzida (Painel B) e a relação glutathione oxidada/reduzida (Painel C).

Os resultados, na Figura 8, mostram um aumento ($p < 0,05$) da glutathione oxidada e uma redução ($p < 0,05$) na relação glutathione GSH/ GSSG nos animais dieta hiperlipídica SED em comparação ao grupo alimentado com dieta padrão SED. O treinamento físico nos animais que receberam dieta hiperlipídica restaurou os níveis de glutathione oxidada para níveis similares ($p > 0,05$) aos ratos submetidos à dieta padrão SED e reduziu a relação glutathione GSH/ GSSG nos animais que receberam dieta hiperlipídica TF em comparação aos ratos da dieta hiperlipídica SED. Os níveis de glutathione reduzida foram similares ($p > 0,05$) em todos os grupos experimentais.

Figura 8 - Complexo glutaciona no fígado



Legenda: Glutathione oxidada (nmol/ml, n=7-12; Painei A), glutathione reduzida (nmol/ml, n=5-11; Painei B), relação glutathione reduzida/oxidada (nmol/ml, n=5-9 Painei C) no fígado de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (30% de banha) ou dieta padrão (AIN-93), durante 13 semanas, e submetidos ao treinamento físico (TF) ou mantidos sedentários (SED), durante as últimas seis semanas de dieta. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo dieta padrão SED. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo dieta hiperlipídica SED. (Anova *One-Way*, seguido do pós-teste Bonferroni).

6.6 Via de sinalização da insulina

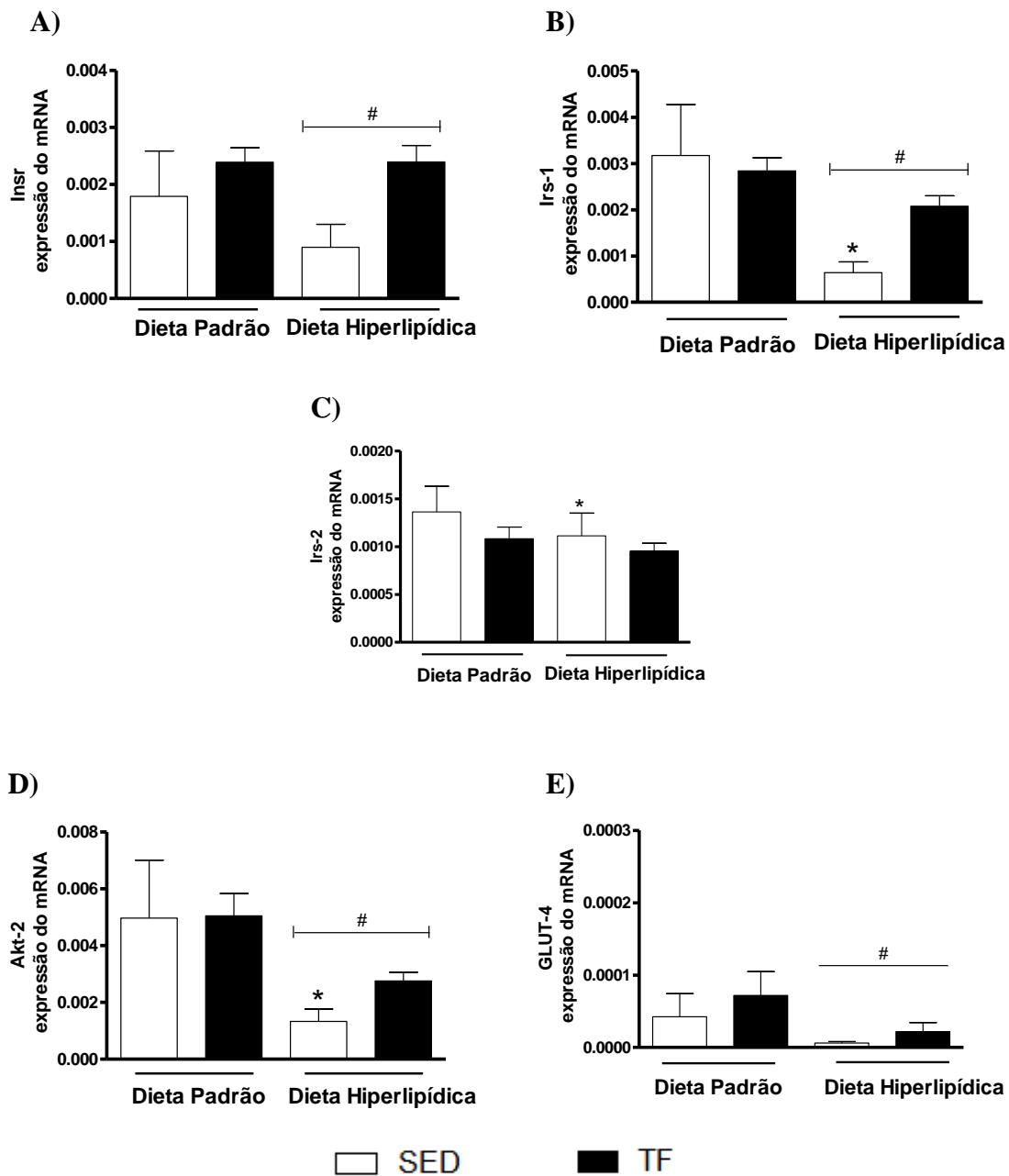
A fim de conferir a via de sinalização da insulina, foram avaliadas a expressão gênica do mRNA do receptor de insulina *Inrs* e do substrato do receptor de insulina *Inr-1*, *Irs-2*, o transportador da glicose tipo 4 (GLUT-4) e da proteína quinase B (AKT-2) no fígado de ratos que receberam dietas (hiperlipídica ou padrão) e foram submetidos ao treinamento físico ou mantidos sedentários.

Os resultados mostram que houve uma redução ($p > 0,05$) da expressão gênica do mRNA do substrato do receptor do insulina *Inrs-1* e *Inrs-2* e da AKT em

comparação ao grupo dieta padrão SED. Isso indica que a dieta influencia a via de sinalização da insulina, dificultando a captação da glicose.

O treinamento físico nos animais que receberam dieta hiperlipídica aumentou ($p < 0,05$) a expressão do receptor de insulina, do substrato do receptor de insulina Inrs-1, do GLUT-4 e da AKT em comparação aos ratos que receberam dieta hiperlipídica. Tais valores se tornaram similares ($p > 0,05$) em relação aos ratos do grupo dieta padrão SED. Os resultados sugerem que o treinamento físico melhora a captação da glicose, atenuando, assim, os efeitos da síndrome metabólica nos animais submetidos à dieta hiperlipídica.

Figura 9 - Avaliação da expressão gênica de mediadores da via de sinalização de insulina no fígado

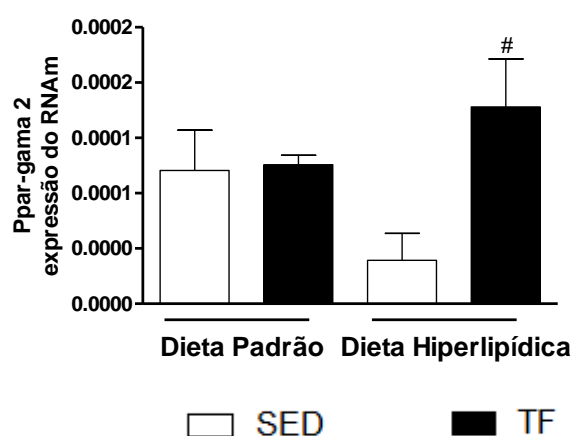


Legenda: Avaliação da expressão gênica de mediadores da via de sinalização de insulina no fígado de ratos alimentados com dieta padrão (AIN-93) ou com dieta hiperlipídica (30% de banha) por 13 semanas e submetidos ao treinamento físico (TF) ou mantidos sedentários (SED) durante as últimas seis semanas de dieta. Substrato do receptor de insulina (Inrs, n=3-4; Painel A), substrato receptor de insulina 1 (Irs-1, n=3-5; Painel B), substrato receptor de insulina 2 (Irs-2, n=3-4; Painel C), transportador de glicose tipo 4 (Glut-4, n=3-5; Painel D) e proteína quinase B (AKT-2, n=3-4; Painel E). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo dieta padrão SED. # $p < 0,05$ em comparação ao grupo dieta hiperlipídica SED. (Anova *One-Way*, seguido do pós-teste Bonferroni).

6.7 Expressão gênica do PPAR γ 2 no fígado

O resultado, na Figura 10, mostra que a dieta hiperlipídica SED ocasiona uma diminuição ($p>0,05$) da expressão gênica do PPAR γ se comparado com os animais que receberam dieta padrão SED. O treinamento físico aumentou ($p<0,05$) a expressão do PPAR γ nos animais submetidos à dieta hiperlipídica TF e se tornou similar ($p>0,05$) em relação aos ratos submetidos à dieta padrão SED.

Figura 10 - Avaliação da expressão gênica do peroxissoma do receptor gama ativado



Legenda: Avaliação da expressão gênica do peroxissoma do receptor gama ativado por proliferador gama (Ppar-gama2) no fígado de ratos alimentados com dieta padrão (AIN-93) ou com dieta hiperlipídica (30% de banha), por 13 semanas, e submetidos ao treinamento físico (TF) ou mantidos sedentários (SED), durante as últimas seis semanas de dieta. * $p<0,05$ em comparação ao grupo dieta padrão SED. # $p<0,05$ em comparação ao grupo dieta hiperlipídica SED. $n= 3-4$ (Anova *One-Way*, seguido do pós-teste Bonferroni).

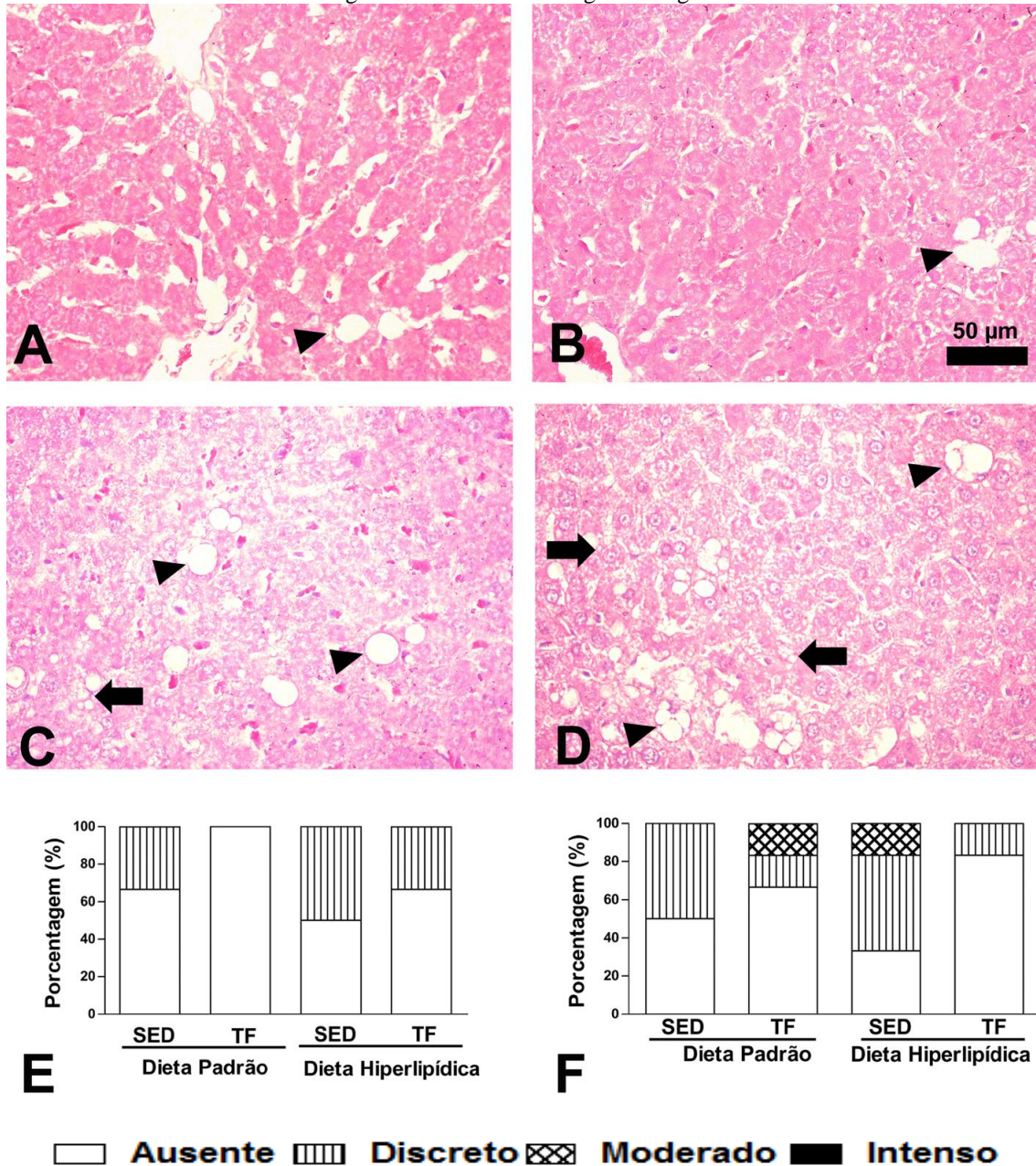
6.8 Avaliação histológica do Fígado

A Figura 11 mostra o exame histológico do fígado nos animais alimentados com as dietas (padrão ou hiperlipídica) e submetidos ao treinamento físico ou mantidos sedentários. Também apresenta a avaliação qualitativa da esteatose macrovesicular e microvesicular por meio da graduação ausente, discreto, moderado e intenso.

Em relação à esteatose macrovesicular, os animais submetidos à dieta hiperlipídica SED tiveram graduação 50% no grau discreto, e o treinamento físico diminuiu a porcentagem do grau discreto para 33% nos animais que receberam dieta hiperlipídica. Já no tocante à esteatose microvesicular, os animais submetidos à dieta

hiperlipídica SED alcançaram uma porcentagem de 50% graduação discreta e 16,6% de graduação moderada, e o treinamento físico diminuiu para apenas 16% no grau discreto. Os resultados mostram que treinamento físico diminui a esteatose macro e microvesicular, ou seja, diminui as gotículas de gordura no fígado.

Figura 11 – Exame histológico do fígado



Legenda: Fotomicrografias do fígado corado com hematoxilina e eosina (HE). A seta representa a esteatose microvesicular; e a cabeça de seta, a esteatose macrovesicular. Painel A, dieta padrão sedentário; Painel B, dieta padrão treinamento físico; Painel C, dieta hiperlipídica sedentário; e Painel D, dieta hiperlipídica treinamento físico. Ampliação de 440×. Barra = 50 micrometros. Avaliação qualitativa da macroesteatose (Painel E) e microesteatose (Painel F) por meio da graduação ausente, discreto, moderado e intenso no fígado de ratos alimentados com dieta padrão (AIN-93) ou dieta hiperlipídica (30% de banha), por 13 semanas, e submetidos ao treinamento físico (TF) ou mantidos sedentários (SED), durante as últimas seis semanas de dieta.

Quadro 1 – Sumário

Síndrome Metabólica Sedentário	Síndrome Metabólica Treinamento
↑ Peso corporal	↓ Peso corporal (normalizou)
↑ Tecido Adiposo Branco	↓ Tecido Adiposo Branco (normalizou)
↑ Colesterol total	= Colesterol total (normalizou)
↑ ALT	↑ ALT
↑ Glicemia	↓ Glicemia (normalizou)
↑ Insulina	↓ Insulina (normalizou)
↑ PAM	↓ PAM (normalizou)
↑ FC	↓ FC (normalizou)
↑ Lactato	↓ Lactato (normalizou)

Quadro 2 – Avaliação do estresse oxidativo no fígado

Síndrome Metabólica Sedentário	Síndrome Metabólica Treinamento
↑ Atividade da SOD	↑ Atividade da SOD
↓ Atividade da catalase	↑ Atividade da catalase (normalizou)
↑ Peroxidação lipídica (TBARS)	↓ TBARS
↑ Proteína Carbonilada	↓ Proteína Carbonilada (normalizou)
↑ Glutathiona Oxidada (GSSG)	↓ GSSG
↓ GSH/GSSG	↑ GSH/GSSG

Quadro 3 – Avaliação da via de sinalização da insulina no fígado

Síndrome Metabólica Sedentário	Síndrome Metabólica Treinamento
= Inrs (controle)	↑ Inrs (normalizou)
↓ IRS-1	↑ IRS-1 (normalizou)
= GLUT-4	↑ GLUT-4 (normalizou)
↓ AKT-2	↑ AKT-2 (normalizou)
↓ PPAR γ - 2	↑ PPAR γ - 2 (normalizou)

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, mostramos que os ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em gordura, durante 13 semanas, e submetidos ao treinamento físico, durante as últimas seis semanas de dieta, apresentaram respostas adaptativas ao treinamento físico, restaurando o balanço oxidativo e a via de sinalização da insulina no fígado, além de recuperar os parâmetros bioquímicos e a pressão arterial.

Nos últimos anos, os estudos realizados sobre a SM ajudaram a elucidar diversos mecanismos da doença. Entretanto, a SM e a obesidade vêm crescendo e se tornando um problema de saúde pública de alta prevalência (PINHEIRO *et al.*, 2004). O avanço da ocorrência da SM pode ser atribuída à grande variedade de distúrbios metabólicos, aumentando a necessidade de melhor entendimento dessa doença e de novas ferramentas para o seu tratamento.

Estudos na literatura mostram que o consumo de dieta hiperlipídica, a predisposição genética e o sedentarismo podem estar relacionados com altos índices de sobrepeso, obesidade central e SM (Furukawa *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; De Castro *et al.*, 2013; Jarukamjorn *et al.*, 2016). Trabalhos anteriores do nosso laboratório (De Castro *et al.*, 2013), com ratos *fischer* jovens (quatro semanas) alimentados com uma dieta hiperlipídica (30% banha) durante 13 semanas, mostraram aumento da PAM e FC, crescimento dos depósitos de tecido adiposo, da glicemia de jejum e da ALT, AST, redução do colesterol HDL, indução de esteatose hepática e infiltrados inflamatórios renais. Com base na pesquisa de De Castro *et al.* (2013), optamos por utilizar a dieta hiperlipídica por 13 semanas em ratos, logo após o desmame.

Para o nosso estudo, foi escolhido o treinamento físico natação por se tratar de um comportamento natural dos roedores e por ser menos estressante do que uma esteira rolante. Atividades estressante podem gerar espécies reativas de oxigênio não diretamente relacionadas ao exercício (Venditti e Di Meo, 1996). Coyle (1995) descreve que os exercícios aeróbicos, como a natação de intensidade leve a moderada, facilitam a mobilização das gorduras por não levarem ao acúmulo de lactato e, conseqüentemente, à reesterificação dos ácidos graxos. Além de recrutarem menor quantidade de fibras do tipo II, que são glicolíticas, e não prejudicam o fluxo sanguíneo dos adipócitos, estimulando a lipase hormônio sensível de forma mais acentuada.

Estudos da literatura (Touati *et al.*, 2011) e de nosso laboratório (Soares *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2015) afirmam que o treinamento físico de

baixa a moderada intensidade promove adaptações fisiológicas eficazes no sentido de induzir benefícios como forma de prevenção de doenças como hipertensão, diabetes e síndrome metabólica. Nesses trabalhos (Burneiko *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2013), o treinamento físico inicia-se junto a dieta com o objetivo de prevenir o desenvolvimento dos distúrbios característicos da SM. Entretanto, pouco são os estudos na literatura (De Farias *et al.*, 2013; Vuković *et al.*, 2014) que avaliam o treinamento físico como tratamento da síndrome metabólica já estabelecida. A importância desse tratamento é que indivíduos sedentários podem apresentar menor adesão à prática regular do treinamento físico e têm grandes chances de desenvolverem a obesidade e demais fatores de risco para a síndrome metabólica.

Para realizar o treinamento físico como forma de tratamento, o primeiro passo foi caracterizar o modelo de síndrome metabólica e nossos dados mostraram que houve um aumento da PAM, FC e no peso corporal na sétima semana de dieta. Adicionalmente, De Castro e colaboradores (De Castro *et al.*, 2013) em dados não publicados, utilizando o mesmo modelo animal e de dieta aplicada no presente estudo, expõem que ratos alimentados com dieta hiperlipídica (30% de banha) na sétima semana apresentaram aumento do nível da glicemia de jejum, PAM e peso corporal. Esses dados, em conjunto com os nossos, indicam que os animais submetidos à dieta hiperlipídica apresentam distúrbios característicos da SM.

No presente estudo, detectamos que o protocolo de treinamento físico utilizado foi eficiente devido aos ratos submetidos à dieta hiperlipídica e ao treinamento físico terem apresentado uma melhora no condicionamento físico observada por meio da redução do lactato sanguíneo (Voltarelli *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2011) e da frequência cardíaca (Voltarelli *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2011), que são considerados marcadores de treinamento físico.

O limiar de lactato sanguíneo é uma medida muito empregada na avaliação da intensidade e da efetividade do treinamento, ou seja, a capacidade de produção/remoção de lactato. O limiar anaeróbico é definido como a mudança metabólica para o sistema anaeróbico em resposta ao aumento exponencial da concentração de CO₂ sanguíneo (Wasserman e Mcilroy, 1964). Em nosso estudo, avaliamos o lactato sanguíneo baseado na metodologia adaptada para ratos submetidos à natação descrita por (Voltarelli *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2011).

Um conjunto de evidências sugere que o treinamento físico regular induz adaptações benéficas sobre doenças associadas ao estresse oxidativo, incluindo

hipertensão, diabetes tipo II e doenças de Alzheimer (Roberts e Sindhu, 2009). Dados anteriores do nosso laboratório (Maia *et al.*, 2015), em ratos com hipertensão renovascular dois rins um clipe (2R1C) submetidos à natação sem carga por quatro semanas, apresentaram efeitos benéficos induzidos pelo treinamento físico como restaurar a pressão arterial média e a bradicardia reflexa, reduzir a deposição de colágeno tanto no miocárdio como nos rins, diminuir o dano oxidativo (TBARS) no ventrículo esquerdo e aumentar a atividade da catalase no ventrículo esquerdo e em ambos dos rins. Esses efeitos do treinamento físico previnem lesões e alterações estruturais no coração e nos rins por diminuírem o estresse oxidativo e reduzirem lesões nesses órgãos que ocorrem durante a hipertensão.

Mostramos também (Sousa *et al.*, 2015) os níveis aumentados da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e do estresse oxidativo no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) área simpatoexcitatória, que são importantes para determinar os altos níveis da pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular 2R1C. Além disso, o treinamento físico foi eficiente em restaurar a pressão arterial média por reverter os níveis da expressão de NOS e a atividade da catalase e por reduzir a concentração de TBARS para níveis normais na RVLM.

Na 13ª semana, nossos dados mostraram que os animais alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentaram um aumento do tecido adiposo retroperitoneal, peso corporal, insulina, PAM, FC, colesterol, glicemia, insulina e estes parâmetros juntamente com o aumento da atividade ALT que é enzima liberada na circulação quando há lesão ou destruição da célula (MOTTA, 2003) estes dados mostram que dieta hiperlipídica levou a uma injúria hepática. Além das análises da atividade dessa enzima hepática, os produtos de estresse oxidativo também têm sido descritos para demonstrar a ocorrência de injúria oxidativa (Perry *et al.*, 2000). Dentre esse estão às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e proteína carbonilada. Os níveis destas substâncias são usados como marcadores indiretos de peroxidação lipídica e oxidação proteica, respectivamente, em células hepáticas (Beal, 2002) e nos animais submetidos a dieta hiperlipídica os animais apresentaram um aumento nestes parâmetros. Esta injúria hepática foi evidenciada pela avaliação qualitativa da esteatose macrovesicular onde os animais dieta hiperlipídica apresentaram 50% graduação discreta e microvesicular onde apresentaram 50% graduação discreta e 16,6% de graduação moderada.

Dados estes que corroboram com Farias e colaboradores (De Farias *et al.*, 2013) que mostram que camundongos *swiss* (dois meses de idade), que receberam dieta

hiperlipídica com 30% de banha durante 30 dias e, logo após, foram submetidos ao treinamento físico natação, cinco vezes na semana, durante oito semanas, apresentaram uma redução do TBARS no tecido adiposo. Já Vuković e colaboradores (Vuković *et al.*, 2014) apontam que ratos *wistar* (quatro semanas de idade), que receberam dieta hiperlipídica (45% de gordura) durante oito semanas e foram submetidos ao treinamento físico esteira da 9^a a 16^a semana de dieta, tiveram redução dos níveis TBARS no fígado.

Nossos dados mostraram ainda que no grupo dieta hiperlipídica houve aumento da SOD e da glutathione oxidada e diminuição da catalase o que poderia levar ao acúmulo de H₂O₂, levando a um aumento do dano oxidativo que foi demonstrado com o aumento da peroxidação lipídica e carbonilação de proteína.

A SOD é a primeira linha de defesa antioxidante e a literatura relata (Peskin e Winterbourn, 2000), ainda, que o tempo de meia vida da SOD é curto (e.g. 0,05 segundos a 0,1mM), sendo assim os animais submetidos a dieta hiperlipídica provavelmente venha ter uma grande quantidade de ânion superóxido dismutado formando H₂O₂ este aumento da atividade da SOD é o resultado de uma resposta adaptativa do estresse oxidativo no tecido hepático.

Em relação à CAT nossos resultados mostraram que o fígado dos animais submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram uma menor atividade enzimática da CAT. Esses resultados corroboram com outros trabalhos que também observaram uma menor atividade da CAT após uma dieta hiperlipídica (Vuković *et al.*, 2014; Jarukamjorn *et al.*, 2016) ou rica em frutose (Botezelli *et al.*, 2012). O efeito biológico associado a esta menor atividade da CAT estaria relacionado ao acúmulo de espécie reativa de oxigênio e H₂O₂ que a atividade da catalase não capaz de decompor o peróxido de hidrogênio, o que poderia agravar o dano hepatocelular.

O sistema glutathione é o principal mecanismo intracelular antioxidante, o qual depende da concentração de glutathione reduzida, e da reação glutathione reduzida/oxidada que são regulados pela síntese “de novo” da glutathione (ciclo redox). Contudo a diminuição de glutathione reduzida tem sido considerada como um marcador de estresse oxidativo (Díaz-Flores *et al.*, 2012). Sob condições normais a glutathione é encontrada principalmente na sua forma reduzida e em quantidades muito pequena, na sua forma oxidada (Cereser *et al.*, 2001). Durante o estresse oxidativo ou sob certas condições patológicas, os níveis de glutathione reduzida e oxidada são significativamente alterados, assim, a determinação da relação reduzida/oxidada fornece informações úteis sobre o estado redox das células (Hewawasam *et al.*, 2003). Em nossos resultados,

houve um aumento da glutathiona oxidada e diminuição da glutathiona reduzida nos grupos de animais submetido à dieta hiperlipídica.

Além disso, o PPAR γ é fortemente expresso em tecidos ricos em mitocôndrias e parece estar envolvido na regulação do metabolismo de lipídeos, lipoproteínas e respostas inflamatórias e no aumento da sensibilidade à insulina no fígado e em outros tecidos (Pang *et al.*, 2009; Fan e Evans, 2015). Nossos dados mostraram que os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram uma diminuição da expressão gênica do PPAR γ -2, acompanhado pela diminuição da expressão gênica do substrato do receptor de insulina Irs-1, Irs2 e AKT-2.

Estes dados corroboram com (Sanghez *et al.*, 2016) que mostraram que camundongos submetidos a dieta hiperlipídica (45% de gordura) tiveram uma redução da expressão gênica das subunidades do receptor de insulina IRS-1 e IRS2.

A interdependência entre o estresse oxidativo e a resistência à insulina pode ser sugerida com base em uma sequência de mecanismo fisiopatológico que se reforça mutuamente. De fato, a geração persistente de espécie reativa de oxigênio pode diminuir a ação da insulina pela ativação de cascata de serina-treonina-cinase que, por sua vez, fosforilam vários alvos, incluindo o receptor de insulina e os substratos dos receptores de insulina (IRS-1 e IRS-2), com a consequente diminuição da fosforilação da tirosina pela insulina (Evans *et al.*, 2005).

Uma das formas de tratar a síndrome metabólica não medicamentosa e através do treinamento físico. O treinamento físico induz resposta adaptativa ao estresse oxidativo no fígado (Hoene e Weigert, 2010). Nossos dados mostraram que os animais que receberam dieta hiperlipídica durante 13 semanas e foram submetidos ao treinamento físico nas últimas 6 semanas de dieta apresentaram uma melhora no condicionamento físico, diminui PAM, FC, colesterol, insulina, glicemia, tecido adiposo branco e peso corporal.

Esses dados corroboram com (Touati *et al.*, 2011), que mostraram que ratos Sprague- Dawley (6 semanas) alimentados com dieta hiperlipídica (62% banha) durante 12 semanas e submetidos a mais 12 semanas de treinamento físico esteira e estes animais apresentaram uma redução no peso corporal, depósito de gordura, colesterol total, insulina e glicose quando comparado aos animais que receberam dieta hiperlipídica e foram mantidos sedentários.

Adicionalmente, esta melhora sistêmica levou uma diminuição do dano oxidativo, reduzindo TABRS e proteína carbonilada e aumentando a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e a relação glutaciona reduzida/ oxidada.

Estudos relatam que a catalase hepática e a glutaciona peroxidase, responsável por apresentar consideravelmente a capacidade de eliminar o H₂O₂, também são alteradas em situações como diabetes e síndrome metabólica (Aragno *et al.*, 1999) e treinamento físico (Wilson e Johnson, 2000; Hoene e Weigert, 2010; Sousa *et al.*, 2015). O equilíbrio entre balanço oxidante e antioxidante é essencial para prevenção do dano oxidativo. O treinamento físico de baixa a moderada intensidade tem sido considerado um importante tratamento não medicamentoso para regular a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD e catalase, e não-enzimática, como a glutaciona em vários tecidos e distúrbios metabólicos; além de melhorar a resistência à insulina e a esteatose hepática (Gomes *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2015; Passos *et al.*, 2015).

Essas adaptações ao treinamento físico no fígado sobre o balanço redox ocorrem, provavelmente, porque o exercício aeróbico induz uma produção transitória de espécies reativas ao oxigênio no fígado, protegendo-o (Lima *et al.*, 2015). Estudos mostram que as espécies reativas, produzidas durante uma sessão de treinamento físico, podem desencadear adaptações importantes, como angiogênese, biogênese mitocondrial e hipertrofia muscular (MORILLAS-RUIZ, 2015). O treinamento físico proporciona a adaptação tentando balaciar às espécies oxidantes e antioxidantes diminuindo assim o dano do oxidativo (Radák *et al.*, 2000).

Lima e colaboradores (Lima *et al.*, 2015) revelam que ratos *wistar* machos (idade 8-12 semanas), que foram induzidos à diabetes por uma injeção intraperitoneal de STZ e submetidos ao treinamento físico moderado na esteira por nove semanas, apresentaram um aumento na produção de peróxido de hidrogênio no fígado dos ratos diabéticos, que foi atenuado pelo treinamento físico e pelo aumento da atividade da SOD, da glutaciona peroxidase e da relação glutaciona reduzida/oxidada. Adicionalmente, (Lima *et al.*, 2013) utilizando ratos Wistar submetidos somente ao treinamento físico natação por 6 semanas com carga de 5% do peso corporal, e os resultados mostraram que houve aumento na atividade da SOD e redução do TBARS no fígado.

Nossos dados apontam que os animais que receberam dieta hiperlipídica foram submetidos ao treinamento físico, melhorou a expressão de via de sinalização da

insulina Inrs, Irs-1, GLUT- 4, AKT-2 e do PPAR γ . Isso sugere que a ativação de PPAR γ , fator regulador chave na lipogênese e no metabolismo de lipídeos no fígado, também contribui para a melhora do metabolismo hepático da glicose, possivelmente por meio de um *cross-talk* entre o PPAR γ e a via de sinalização intracelular da insulina hepática (Fan e Evans, 2015).

Marinho e colaboradores (Marinho *et al.*, 2014) apresentam que camundongos *swiss* com seis semanas de idade, alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas e submetidos ao treinamento de natação uma hora por dia, com ou sem sobrecarga de 5%, obtiveram melhora na sensibilidade à insulina no fígado, corroborando com nossos resultados.

Zhao *et al.*, (2004) em um protocolo tanto de treinamento e outro de prevenção utilizando ratos Sprague-Dawley alimentados com uma dieta hiperlipídica (59,8% de gordura) apresentaram um aumento na expressão gênica do PPAR γ no fígado. O protocolo de prevenção inicia-se a dieta hiperlipídica junto com o treinamento físico durante 8 semanas, já o de tratamento consistiu em submeter os animais a dieta hiperlipídica durante 8 semanas e nas 4 últimas semanas de dieta esse animais foram submetidos ao treinamento de natação.

A melhora destes parâmetros induzidas pelo treinamento físico levou uma melhora na injúria hepática nos animais diminuindo a avaliação qualitativa da esteatose macrovesicular onde os animais dieta hiperlipídica treinamento físico apresentaram 33% graduação discreta (dieta hiperlipídica SED 50% discreta) e microvesicular onde apresentaram 16% graduação discreta (dieta hiperlipídica SED 50% graduação discreta e 16,6% de graduação moderada).

Em resumo, o presente estudo mostrou que o treinamento físico (natação) induz adaptações benéficas no fígado de ratos submetidos à dieta hiperlipídica, levando ao aumento da relação glutatona reduzida/oxidada, da atividade da catalase e da SOD, à redução do TBARS e da proteína carbonilada, mantendo o estado redox no fígado. O treinamento físico melhorou os parâmetros fisiológicos e foi eficiente em restaurar a via de sinalização da insulina e da expressão do PPAR γ nos ratos submetidos à dieta hiperlipídica e ao treinamento físico.

8 CONCLUSÃO

Ratos com SM induzida por dieta rica em gordura, durante treze semanas, e submetidos ao treinamento físico, nas últimas seis semanas de dietas apresentaram resposta adaptativa ao treinamento físico, restaurando o balanço oxidativo e via de sinalização da insulina no fígado e parâmetros bioquímicos, cardiovasculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660>>.

ABDILLA, N. *et al.* Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. **J Hum Hypertens**, v. 21, n. 1, p. 68-75, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17066087>>.

AHMADIAN, M. *et al.* PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nat Med**, v. 19, n. 5, p. 557-566, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652116>>.

ALY, F. Z.; KLEINER, D. E. Update on fatty liver disease and steatohepatitis. **Adv Anat Pathol**, v. 18, n. 4, p. 294-300, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21654360>>.

AMENT, Z. *et al.* PPAR-pan activation induces hepatic oxidative stress and lipidomic remodelling. **Free Radic Biol Med**, v. 95, p. 357-368, jun 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26654758>>.

ANGELOPOULOU, R.; LAVRANOS, G.; MANOLAKOU, P. ROS in the aging male: model diseases with ROS-related pathophysiology. **Reprod Toxicol**, v. 28, n. 2, p. 167-171, set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379805>>.

ARAGNO, M. *et al.* Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 11-12, p. 1467-74, Jun 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401610>>.

ATTIE, A. D.; SCHERER, P. E. Adipocyte metabolism and obesity. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S395-399, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19017614>>.

BATTAULT, S. *et al.* Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. **Hypertens Res**, v. 39, n. 2, p. 70-78, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26537830>>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.

72, p. 248-254, maio 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>>.

BRAND, M. D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. **Exp Gerontol**, v. 35, n. 6-7, p. 811-820, set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053672>>.

BURNEIKO, R. C. *et al.* Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem Toxicol**, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516366>>.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Toxicology rethinks its central belief. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 691-692, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610596>>.

CASTRO, U. G. de *et al.* Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 136, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24044579>>.

DELBIN, M. A.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Role of exercise training on pulmonary ischemia/reperfusion and inflammatory response. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 4, p. 552-561, out./dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305929>>.

DEPIERI, T. Z. *et al.* UCP-3: regulation of genic expression on skeletal muscle and possible role on body weight control. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 48, n. 3, p. 337-344, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640895>>.

DIETERICH, S. *et al.* Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-39, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618301>>.

DOMINICI, F. P. *et al.* Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1-7). **Clin Sci (Lond)**, v. 126, n. 9, p. 613-630, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24450744>>.

DRAPER, H. H. *et al.* A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med**, v. 15,

n. 4, p. 353-363, out. 1993. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225017>>.

DUNCAN, A. W. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. **Semin Cell Dev Biol**, v. 24, n. 4, p. 347-56, Apr 2013. ISSN 1096-3634. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333793>>.

DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I. Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. **Sao Paulo Med J**, v. 119, n. 3, p. 122-127, maio 2001. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11391456>>.

ECHTAY, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 10, p. 1351-1371, nov. 2007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936181>>.

ESPINOSA, A. *et al.* NADPH oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. **J Biol Chem**, v. 284, n. 4, p. 2568-2575, jan. 2009. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028699>>.

EVANS, J. L.; MADDUX, B. A.; GOLDFINE, I. D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 7-8, p. 1040-1052, jul./ago. 2005. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15998259>>.

FAN, W.; EVANS, R. PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. **Curr Opin Cell Biol**, v. 33, p. 49-54, abr. 2015. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25486445>>.

FORMIGUERA, X.; CANTÓN, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 18, n. 6, p. 1125-1146, dez. 2004. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561643>>.

FRANSSEN, R. *et al.* Obesity and dyslipidemia. **Med Clin North Am**, v. 95, n. 5, p. 893-902, set. 2011. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21855698>>.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, set. 2011. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21473702>>.

FURUKAWA, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-61, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599400>>.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**, v. 316, n. 2, p. 129-139, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723556>>.

GOMES, R. M. *et al.* Moderate exercise restores pancreatic beta-cell function and autonomic nervous system activity in obese rats induced by high-fat diet. **Cell Physiol Biochem**, v. 32, n. 2, p. 310-21, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942282>>.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, Suppl 1, p. S110-118, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749275>>.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-255, maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155533>>.

HOENE, M.; WEIGERT, C. The stress response of the liver to physical exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 16, p. 163-83, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839498>>.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Química Nova**, v. 31, 2008.

ILKUN, O.; BOUDINA, S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 27, p. 4806-4817, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23323621>>.

JARUKAMJORN, K. *et al.* A High-Fat, High-Fructose Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases the Risk and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. **Scientifica**, Cairo, v. 2016, p. 5029414, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27019761>>.

JUDGE, A. R.; DODD, S. L. Xanthine oxidase and activated neutrophils cause oxidative damage to skeletal muscle after contractile claudication. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 286, n. 1, p. H252-256, jan. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12969896>>.

König D, B. A. Exercise and oxidative stress: Is there a need for additional antioxidants. *Öster J Sport Med.* 2002;3(1):6-15.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-643, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766250>>.

LEW, H.; PYKE, S.; QUINTANILHA, A. Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. **FEBS Lett**, v. 185, n. 2, p. 262-6, jun. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3996604>>.

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-78, 1990. ISSN 0076-6879. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978225>>.

_____. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-57, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015469>>.

LI, G. *et al.* Exercise training attenuates sympathetic activation and oxidative stress in diet-induced obesity. **Physiol Res**, v. 64, n. 3, p. 355-367, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536322>>.

LIMA, T. I. *et al.* Effect of exercise training on liver antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats. **Life Sci**, v. 128, p. 64-71, maio 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25744399>>.

LIU, J. *et al.* The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. **J Diabetes Res**, v. 2013, p. 585897, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23841103>>.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, nov. 1951. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>>.

LUCA, C. de; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Lett**, v. 582, n. 1, p. 97-105, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18053812>>.

MAIA, R. C. *et al.* Time-course effects of aerobic exercise training on cardiovascular and renal parameters in 2K1C renovascular hypertensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 11, p. 1010-1022, nov. 2015. ISSN 1414-431X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26270472>>.

MARCHESINI, G. *et al.* Obesity-associated liver disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 11, Suppl 1, p. S74-80, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18987273>>.

MARINHO, R. *et al.* Effects of different intensities of physical exercise on insulin sensitivity and protein kinase B/Akt activity in skeletal muscle of obese mice. **Einstein**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 82-89, jan./mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24728251>>.

MATSUSUE, K. *et al.* Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. **J Clin Invest**, v. 111, n. 5, p. 737-347, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618528>>.

MENON, V. *et al.* Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. **Diabet Med**, v. 21, n. 12, p. 1346-1352, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569139>>.

MORILLAS-RUIZ, J. M.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, P. Oxidative Stress and Antioxidant Defenses Induced by Physical Exercise, Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. Dr. Sivakumar Joghi Thatha Gowder (Ed.), InTech, 2015.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J**, v. 417, n. 1, p. 1-13, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061483>>.

NAM, M.; COOPER, M. P. Role of Energy Metabolism in the Brown Fat Gene Program. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 104, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26175716>>.

NAN, Y. M. *et al.* Rosiglitazone prevents nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. **Scand J Gastroenterol**, v. 44, n. 3, p. 358-365, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991162>>.

PANG, M. *et al.* PPARdelta agonist attenuates alcohol-induced hepatic insulin resistance and improves liver injury and repair. **J Hepatol**, v. 50, n. 6, p. 1192-1201, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398227>>.

PAPANDREOU, D.; ROUSSO, I.; MAVROMICHALIS, I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. **Clin Nutr**, v. 26, n. 4, p. 409-415, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449148>>.

PASSOS, E. *et al.* Role of physical exercise on hepatic insulin, glucocorticoid and inflammatory signaling pathways in an animal model of non-alcoholic steatohepatitis. **Life Sci**, v. 123, p. 51-60, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534442>>.

PAULI, J. R. *et al.* Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. **Mech Ageing Dev**, v. 131, n. 5, p. 323-329, maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307567>>.

PESKIN, A. V.; WINTERBOURN, C. C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). **Clin Chim Acta**, v. 293, n. 1-2, p. 157-166, mar. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699430>>.

PINGITORE, A. *et al.* Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. **Nutrition**, v. 31, n. 7-8, p. 916-922, jul./ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26059364>>.

RADÁK, Z. *et al.* Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. **Arch Biochem Biophys**, v. 376, n. 2, p. 248-251, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775409>>.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 153-159, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191751>>.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, 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. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, nov. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312>>.

RICQUIER, D.; CASTEILLA, L.; BOUILLAUD, F. Molecular studies of the uncoupling protein. **FASEB J**, v. 5, n. 9, p. 2237-2242, jun. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860614>>.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci**, v. 84, n. 21-22, p. 705-712, maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281826>>.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; CINTRA, D. E. **Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular**.

ROSSAINT, J.; ZARBOCK, A. Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. **J Innate Immun**, v. 5, n. 4, p. 348-357, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257511>>.

RUDICH, A.; KANETY, H.; BASHAN, N. Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction. **Trends Endocrinol Metab**, v. 18, n. 8, p. 291-299, out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855109>>.

SAKURAI, T. *et al.* Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 379, n. 2, p. 605-609, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121629>>.

SEBASTIÁN, D. *et al.* Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 14, p. 5523-5528, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427360>>.

SOARES, E. R. *et al.* Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 6, p. 573-582, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519638>>.

SOUSA, L. E. *et al.* Exercise training restores oxidative stress and nitric oxide synthases in the rostral ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats. **Free Radic Res**, v. 49, n. 11, p. 1335-1343, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26140386>>.

STEINBACHER, P.; ECKL, P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 356-377, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866921>>.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1478-1485, nov. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268692>>.

TOUATI, S. *et al.* Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 3, p. 398-407, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631645>>.

URAKAWA, H. *et al.* Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 10, p. 4673-4676, out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557439>>.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>>.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 331, n. 1, p. 63-68, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660684>>.

VIDELA, L. A. *et al.* Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 12, p. 555-558, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049925>>.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 11, p. 1389-1394, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426640>>.

VUKOVIĆ, R. *et al.* Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. **Croat Med J**, v. 55, n. 3, p. 218-227, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24891280>>.

WANG, X.; HAI, C. Redox modulation of adipocyte differentiation: hypothesis of "Redox Chain" and novel insights into intervention of adipogenesis and obesity. **Free Radic Biol Med**, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26187871>>.

WASSERMAN, K.; MCILROY, M. B. DETECTING THE THRESHOLD OF ANAEROBIC METABOLISM IN CARDIAC PATIENTS DURING EXERCISE. **Am**

J Cardiol, v. 14, p. 844-852, dez. 1964. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14232808>>.

WESTHOFF, G.; RAU, R.; ZINK, A. Radiographic joint damage in early rheumatoid arthritis is highly dependent on body mass index. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 11, p. 3575-3582, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17968909>>.

WILSON, D. O.; JOHNSON, P. Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. **J Appl Physiol (1985)**, v. 88, n. 5, p. 1791-1796, maio 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10797143>>.

ZHAO, C. Y. *et al.* Peroxisome proliferator activated receptor-gamma in pathogenesis of experimental fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 9, p. 1329-1332, maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15112352>>.

ABDILLA, N. *et al.* Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. **J Hum Hypertens**, v. 21, n. 1, p. 68-75, Jan 2007. ISSN 0950-9240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17066087> >.

ADAMS, L. A.; ANGULO, P.; LINDOR, K. D. Nonalcoholic fatty liver disease. **CMAJ**, v. 172, n. 7, p. 899-905, Mar 2005. ISSN 1488-2329. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15795412> >.

AHMADIAN, M. *et al.* PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nat Med**, v. 19, n. 5, p. 557-66, May 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652116> >.

ALY, F. Z.; KLEINER, D. E. Update on fatty liver disease and steatohepatitis. **Adv Anat Pathol**, v. 18, n. 4, p. 294-300, Jul 2011. ISSN 1533-4031. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21654360> >.

AMENT, Z. *et al.* PPAR-pan activation induces hepatic oxidative stress and lipidomic remodelling. **Free Radic Biol Med**, v. 95, p. 357-68, Jun 2016. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26654758> >.

ANGELOPOULOU, R.; LAVRANOS, G.; MANOLAKOU, P. ROS in the aging male: model diseases with ROS-related pathophysiology. **Reprod Toxicol**, v. 28, n. 2, p. 167-71, Sep 2009. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19379805> >.

ARAGNO, M. *et al.* Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 11-12, p. 1467-74, Jun 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401610> >.

ATTIE, A. D.; SCHERER, P. E. Adipocyte metabolism and obesity. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S395-9, Apr 2009. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19017614> >.

BATTAULT, S. et al. Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling. **Hypertens Res**, v. 39, n. 2, p. 70-8, Feb 2016. ISSN 1348-4214. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26537830> >.

BOSS, O.; HAGEN, T.; LOWELL, B. B. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. **Diabetes**, v. 49, n. 2, p. 143-56, Feb 2000. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10868929> >.

BURNEIKO, R. C. et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem Toxicol**, v. 44, n. 7, p. 1167-72, Jul 2006. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516366> >.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Toxicology rethinks its central belief. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 691-2, Feb 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610596> >.

DE CASTRO, U. G. et al. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 136, 2013. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24044579> >.

DE FARIAS, J. M. et al. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. **Horm Metab Res**, v. 45, n. 3, p. 190-6, Mar 2013. ISSN 1439-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972182> >.

DE LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Lett**, v. 582, n. 1, p. 97-105, Jan 2008. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18053812> >.

DELBIN, M. A.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Role of exercise training on pulmonary ischemia/reperfusion and inflammatory response. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 4, p. 552-61, 2009 Oct-Dec 2009. ISSN 1678-9741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305929> >.

DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33-9, 2000 Jan 4-11 2000. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618301> >.

DOMINICI, F. P. et al. Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1-7). **Clin Sci (Lond)**, v. 126, n. 9, p. 613-30, May 2014. ISSN 1470-8736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24450744> >.

DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med**, v. 15, n. 4, p. 353-63, Oct 1993. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225017> >.

DUNCAN, A. W. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. **Semin Cell Dev Biol**, v. 24, n. 4, p. 347-56, Apr 2013. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333793> >.

DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I. Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. **Sao Paulo Med J**, v. 119, n. 3, p. 122-7, May 2001. ISSN 1516-3180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11391456> >.

ECHTAY, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 10, p. 1351-71, Nov 2007. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936181> >.

ESPINOSA, A. et al. NADPH oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. **J Biol Chem**, v. 284, n. 4, p. 2568-75, Jan 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028699> >.

EVANS, J. L.; MADDUX, B. A.; GOLDFINE, I. D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 7-8, p. 1040-52, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15998259> >.

FAN, W.; EVANS, R. PPARs and ERRs: molecular mediators of mitochondrial metabolism. **Curr Opin Cell Biol**, v. 33, p. 49-54, Apr 2015. ISSN 1879-0410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25486445> >.

FORMIGUERA, X.; CANTÓN, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 18, n. 6, p. 1125-46, Dec 2004. ISSN 1521-6918. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561643> >.

FRANSEN, R. et al. Obesity and dyslipidemia. **Med Clin North Am**, v. 95, n. 5, p. 893-902, Sep 2011. ISSN 1557-9859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21855698> >.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 6, p. 1583-606, Sep 2011. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21473702> >.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 114, n. 12, p. 1752-61, Dec 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599400> >.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**, v. 316, n. 2, p. 129-39, Mar 2010. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723556> >.

GOMES, R. M. et al. Moderate exercise restores pancreatic beta-cell function and autonomic nervous system activity in obese rats induced by high-fat diet. **Cell Physiol Biochem**, v. 32, n. 2, p. 310-21, 2013. ISSN 1421-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942282> >.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S110-8, Feb 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749275> >.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-55, May 2004. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155533> >.

HOENE, M.; WEIGERT, C. The stress response of the liver to physical exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 16, p. 163-83, 2010. ISSN 1077-5552. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839498> >.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. Química Nova. 31 2008.

ILKUN, O.; BOUDINA, S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 27, p. 4806-17, 2013. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23323621> >.

JARUKAMJORN, K. et al. A High-Fat, High-Fructose Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases the Risk and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. **Scientifica (Cairo)**, v. 2016, p. 5029414, 2016. ISSN 2090-908X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27019761> >.

JUDGE, A. R.; DODD, S. L. Xanthine oxidase and activated neutrophils cause oxidative damage to skeletal muscle after contractile claudication. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 286, n. 1, p. H252-6, Jan 2004. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12969896> >.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-43, Apr 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766250> >.

LEW, H.; PYKE, S.; QUINTANILHA, A. Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. **FEBS Lett**, v. 185, n. 2, p. 262-6, Jun 1985. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3996604> >.

LI, G. et al. Exercise training attenuates sympathetic activation and oxidative stress in diet-induced obesity. **Physiol Res**, v. 64, n. 3, p. 355-67, Jun 2015. ISSN 1802-9973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536322> >.

LIMA, T. I. et al. Effect of exercise training on liver antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats. **Life Sci**, v. 128, p. 64-71, May 2015. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25744399> >.

LIU, J. et al. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. **J Diabetes Res**, v. 2013, p. 585897, 2013. ISSN 2314-6745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23841103> >.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >.

MAIA, R. C. et al. Time-course effects of aerobic exercise training on cardiovascular and renal parameters in 2K1C renovascular hypertensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 11, p. 1010-22, Nov 2015. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26270472> >.

MARINHO, R. et al. Effects of different intensities of physical exercise on insulin sensitivity and protein kinase B/Akt activity in skeletal muscle of obese mice. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 12, n. 1, p. 82-9, 2014 Jan-Mar 2014. ISSN 2317-6385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24728251> >.

MATSUSUE, K. et al. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. **J Clin Invest**, v. 111, n. 5, p. 737-47, Mar 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618528> >.

MENON, V. et al. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. **Diabet Med**, v. 21, n. 12, p. 1346-52, Dec 2004. ISSN 0742-3071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569139> >.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J**, v. 417, n. 1, p. 1-13, Jan 2009. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061483> >.

NAM, M.; COOPER, M. P. Role of Energy Metabolism in the Brown Fat Gene Program. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 104, 2015. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26175716> >.

NAN, Y. M. et al. Rosiglitazone prevents nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. **Scand J Gastroenterol**, v. 44, n. 3, p. 358-65, 2009. ISSN 1502-7708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18991162> >.

PANG, M. et al. PPARdelta agonist attenuates alcohol-induced hepatic insulin resistance and improves liver injury and repair. **J Hepatol**, v. 50, n. 6, p. 1192-201, Jun 2009. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19398227> >.

PAPANDREOU, D.; ROUSSO, I.; MAVROMICHALIS, I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. **Clin Nutr**, v. 26, n. 4, p. 409-15, Aug 2007. ISSN 0261-5614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449148> >.

PASSOS, E. et al. Role of physical exercise on hepatic insulin, glucocorticoid and inflammatory signaling pathways in an animal model of non-alcoholic steatohepatitis. **Life Sci**, v. 123, p. 51-60, Feb 2015. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25534442> >.

PAULI, J. R. et al. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. **Mech Ageing Dev**, v. 131, n. 5, p. 323-9, May 2010. ISSN 1872-6216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307567> >.

PESKIN, A. V.; WINTERBOURN, C. C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). **Clin Chim Acta**, v. 293, n. 1-2, p. 157-66, Mar 2000. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699430> >.

PINGITORE, A. et al. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. **Nutrition**, v. 31, n. 7-8, p. 916-922, 2015 Jul-Aug 2015. ISSN 1873-1244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26059364> >.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 153-9, Jan 2008. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191751> >.

RADÁK, Z. et al. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. **Arch Biochem Biophys**, v. 376, n. 2, p. 248-51, Apr 2000. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775409> >.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, 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. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.

RICQUIER, D.; CASTEILLA, L.; BOUILLAUD, F. Molecular studies of the uncoupling protein. **FASEB J**, v. 5, n. 9, p. 2237-42, Jun 1991. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860614> >.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci**, v. 84, n. 21-22, p. 705-12, May 2009. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19281826> >.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; CINTRA, D. E. **Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular**.

ROSSAINT, J.; ZARBOCK, A. Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. **J Innate Immun**, v. 5, n. 4, p. 348-57, 2013. ISSN 1662-8128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257511> >.

RUDICH, A.; KANETY, H.; BASHAN, N. Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction. **Trends Endocrinol Metab**, v. 18, n. 8, p. 291-9, Oct 2007. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855109> >.

SAFIEDEEN, Z.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; MARTINEZ, M. C. Dialogue between endoplasmic reticulum and mitochondria as a key actor of vascular dysfunction associated to metabolic disorders. **Int J Biochem Cell Biol**, May 2016. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208732> >.

SAKURAI, T. et al. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 379, n. 2, p. 605-9, Feb 2009. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121629> >.

SEBASTIÁN, D. et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 14, p. 5523-8, Apr 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427360> >.

SOARES, E. R. et al. Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 6, p. 573-82, Jun 2011. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519638> >.

SOUSA, L. E. et al. Exercise training restores oxidative stress and nitric oxide synthases in the rostral ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats. **Free Radic Res**, v. 49, n. 11, p.

1335-43, 2015. ISSN 1029-2470. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26140386>>.

STEINBACHER, P.; ECKL, P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 356-77, 2015. ISSN 2218-273X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866921>>.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1478-85, Nov 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268692>>.

TONKONOGLI, M. et al. Endurance training increases stimulation of uncoupling of skeletal muscle mitochondria in humans by non-esterified fatty acids: an uncoupling-protein-mediated effect? **Biochem J**, v. 351 Pt 3, p. 805-10, Nov 2000. ISSN 0264-6021. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11042137>>.

TOUATI, S. et al. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 3, p. 398-407, Mar 2011. ISSN 1530-0315. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631645>>.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; EZAKI, O. Mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) in skeletal muscle. **Front Biosci**, v. 6, p. D570-4, Mar 2001. ISSN 1093-9946. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229874>>.

URAKAWA, H. et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 10, p. 4673-6, Oct 2003. ISSN 0021-972X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557439>>.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978905>>.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 331, n. 1, p. 63-8, Jul 1996. ISSN 0003-9861. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660684>>.

VIDAL-PUIG, A. et al. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 235, n. 1, p. 79-82, Jun 1997. ISSN 0006-291X. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9196039>>.

VIDELA, L. A. et al. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 12, p. 555-8, Dec 2006. ISSN 1471-4914. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049925>>.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 11, p. 1389-94, Nov 2002. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426640> >.

VUKOVIĆ, R. et al. Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. **Croat Med J**, v. 55, n. 3, p. 218-27, Jun 2014. ISSN 1332-8166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24891280> >.

WANG, X.; HAI, C. Redox modulation of adipocyte differentiation: hypothesis of "Redox Chain" and novel insights into intervention of adipogenesis and obesity. **Free Radic Biol Med**, Jul 2015. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26187871> >.

WASSERMAN, K.; MCILROY, M. B. DETECTING THE THRESHOLD OF ANAEROBIC METABOLISM IN CARDIAC PATIENTS DURING EXERCISE. **Am J Cardiol**, v. 14, p. 844-52, Dec 1964. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14232808> >.

WESTHOFF, G.; RAU, R.; ZINK, A. Radiographic joint damage in early rheumatoid arthritis is highly dependent on body mass index. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 11, p. 3575-82, Nov 2007. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17968909> >.

WILSON, D. O.; JOHNSON, P. Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. **J Appl Physiol (1985)**, v. 88, n. 5, p. 1791-6, May 2000. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10797143> >.

ZHAO, C. Y. et al. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma in pathogenesis of experimental fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 9, p. 1329-32, May 2004. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15112352> >.