



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
- PPGCS**

**JONI MARCIO DE FARIAS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE  
PARAMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E MOLECULAR  
EM DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS  
A DIETA HIPERLIPÍDICA.**

Tese de Doutorado Apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde para obtenção  
do título de Doutor em Ciências da  
Saúde.

Orientador: Dr. Ricardo Aurino de  
Pinho

Co-orientador: Dr. Cláudio  
Teodoro de Souza

**CRICIUMA,  
JULHO 2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F224a Farias, Joni Marcio de.

Avaliação dos efeitos do exercício físico sobre parâmetros de estresse oxidativo e molecular em diferentes tecidos de camundongos expostos a dieta hiperlipídica / Joni Marcio de Farias ; orientador: Ricardo Aurino de Pinho ; co-orientador: Claudio Teodoro de Souza. – Criciúma : Ed. do Autor, 2012.  
114 f. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul  
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde, Criciúma, 2012.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato Joni Marcio de Farias sob o título “**Avaliação dos efeitos do exercício físico sobre parâmetros de estresse oxidativo e molecular em diferentes tecidos de camundongos expostos a dieta hiperlipídica**” para obtenção do grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido ao candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito  A .

Criciúma, SC, 31 de julho de 2012.

**Prof. Dr. Gustavo da Costa Ferreira**

Membro Relator - UNESC

**Prof. Dra. Alexandra Ioppi Zugno**

Membro Interno – UNESC

**Prof. Dr. Edio Luiz Petroski**

Membro Externo - UFSC

**Prof. Dr. Fabrizio Caputo**

Membro Externo - UDESC

**Prof. Dr. Ricardo Augusto de Pinho**  
Orientador

**Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**  
Coordenador do PPGCS



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as oportunidades pessoais e profissionais a mim dada.

Aos meus pais Jaime e Maria pelo dom da vida e por todos os ensinamentos e valores de vida passados os quais primo em cada momento de minha vida.

Aos meus irmãos Jane, Jussara e Juliano, que mesmo não estando juntos fisicamente em todos os momentos, em sentimento nunca nos separamos e certamente no plano mental nos reforçamos como família.

A minha esposa Daniela e meu filho Vinicius, aos quais primeiramente peço desculpas pelas ausências e agradeço a cada palavra de incentivo nos momentos de fraquejo e indecisão, muito obrigado por tudo, vocês são meu porto seguro, amo vocês.

Aos meus amigos Cleber, Victor e Eduardo, muito mais do que colegas profissionais, são amigos pessoais que sempre estão comigo no trabalho e na vida pessoal, contribuindo para meu sucesso e realização pessoal e profissional.

A UNESC que me oportunizou a possibilidade de realizar este doutorado e por ter me acolhido há 15 anos como profissional, meu muito obrigado.

Aos funcionários do curso de Educação Física, em especial a Selma, Deise e o Daniel, obrigado por entender a minha forma de trabalho e desculpe se em algum momento não fui correto com vocês, mas pode ter certeza que sempre serei leal a vocês.

A banca examinadora que aceitou o convite em participar deste trabalho, muito obrigado.

Ao meu co-orientador Cláudio Souza e ao Fábio Lira, que me auxiliaram em vários momentos na construção deste trabalho.

Ao meu orientador prof. Ricardo Pinho, muito obrigado por ter me incentivado e desafiado a fazer este curso de doutorado, certamente se não fosse por você talvez eu não tivesse realizado, e por compreender minhas atividades profissionais, as quais não abandonei durante toda a minha formação no doutorado, muito obrigado de coração.

A Secretaria de Educação do Estado de Santa Catarina que me oportunizou a bolsa de estudos FUMDES, providencial no orçamento deste curso.



## **MENSAGEM**

**“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades da vida, lembrai-vos que as grandes proezas da história foram conquistadas do que parecia impossível”.**





## RESUMO

**Conhecimento:** A dieta hiperlipídica induz a obesidade e com isso um aumento no estresse oxidativo e resistência à insulina em vários tecidos, por meio das lipases como, por exemplo, o lipase hormônio sensível, triglicerol lipase do tecido adiposo (ATGL), os receptores de adiponectina (AdipoR1 e AdipoR2) e proteína de adaptação endossomal (APPL1). Por outro lado o treinamento físico reduz o tecido adiposo, aumenta o status oxidante, previne progressão da resistência a insulina. **Objetivo:** Verificar a contribuição do treinamento físico nos parâmetros de estresse oxidativo e resistência a insulina em tecidos periféricos de animais expostos a dieta hiperlipídica. **Método:** Foram utilizados 24 camundongos divididos em 4 grupos (n=6); Controle (C); Controle e Exercício (C+Ex); Obeso (DHL) e Obeso + exercício (DHL+Ex). Os animais foram submetidos a uma dieta hiperlipídica por 90 dias e a um protocolo de treinamento físico, crônico, na modalidade de natação e sua intensidade controlada pela análise de lactato. Os animais mortos após 48 horas depois da última sessão de exercício e foram retirados cirurgicamente amostras de tecido adiposo, fígado e músculo esquelético para avaliar a via da sinalização molecular e parâmetros de estresse oxidativo. **Resultados:** houve ganho de peso corporal após 90 dias de dieta hiperlipídica e o treinamento físico preveniu o ganho excessivo. No tecido adiposo aumentou a peroxidação lipídica e carbonilação das proteínas e diminuiu significativamente após o treinamento físico, níveis de proteína CGI-58 foi reduzida e FAS foi aumentada no obeso, e no treinado houve aumento de ATGL. A fosforilação do receptor da insulina e substrato do receptor da insulina e Akt foram diminuídas em todos nos tecidos avaliados quando comparados DHL com C, o mesmo ocorreu com AdipoR1 (adiposo e músculo esquelético) e AdipoR2 (fígado) e a APPL1, no entanto o treinamento físico demonstrou capacidade de melhorar a fosforilação nestes tecidos. **Conclusão:** O exercício físico tem um importante papel da redução de estresse oxidativo e na regulação das proteínas que envolvem a lipólise em obesos. Resultados semelhantes foram observados na ação da insulina que também apresentou melhoras por meio dos receptores de adiponectina e APPL1 em todos os tecidos avaliados (adiposo, músculo e fígado) de camundongos obesos. **Palavras-chave:** Obesidade. Resistência à insulina. Estresse Oxidativo. Exercício Físico.



## ABSTRACT

**Knowledge:** The high-fat diet induced obesity and thereby an increase in oxidative stress and insulin resistance in many tissues, through lipases as, for example, hormone sensitive lipase, adipose tissue lipase triglycerol (ATGL) receptors adiponectin (AdipoR1 and AdipoR2) and adapted endosomal protein (APPL1). On the other hand reduces the physical training adipose tissue, increases the antioxidant status, and prevents the progression of insulin resistance. **Objective:** To assess the contribution of physical training on parameters of oxidative stress and insulin resistance in peripheral tissues of animals exposed to high fat diet. **Method:** We used 24 mice divided into four groups (n = 6) and control (C) Control and Exercise (C + Ex), Obese (DHL) and Obese + exercise (Ex + DHL). The animals were subjected to a high fat diet for 90 days and a physical training protocol, chronic, in the form of swimming and its intensity controlled by the analysis of lactate. Animals killed after 48 hours after the last exercise session and were surgically removed samples of adipose tissue, liver and skeletal muscle to assess the molecular signaling pathway and oxidative stress parameters. **Results:** There was weight gain after 90 days of fat diet and exercise training prevented the excessive weight gain. Increased in adipose tissue lipid peroxidation and protein carbonylation and decreased significantly after exercise training, levels of CGI-58 protein was reduced and FAS was increased in the obese, and trained in an increase of ATGL. The phosphorylation of the insulin receptor and substrate of the insulin receptor and Akt was decreased in all tissues analyzed when compared with C DHL, the same occurred with AdipoR1 (fat and muscle) and AdipoR2 (liver) and APPL1, however physical training demonstrated the ability to enhance phosphorylation in these tissues. **Conclusion:** Exercise has an important role in reducing oxidative stress and protein regulation involving lipolysis in the obese. Similar results were observed in insulin action that also showed improvement through the adiponectin receptors and APPL1 evaluated in all tissues (adipose, muscle and liver) from obese mice.

**Keywords:** Obesity, Insulin Resistance, Oxidative Stress, Physical Exercise.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Adipo R1 – Receptor de Adiponectina 1  
Adipo R2 – Receptor de Adiponectina 2  
AGL – Ácido Graxo Livre  
Agrp – Proteína relacionada Agouti  
Akt (*Protein Kinase B/Akt*) – proteína quinase B  
APPL1 – Proteína Adaptadora Endossomal 1  
ATGL – Triglicerol Lípase do Tecido Adiposo  
CART – Transcrição relacionada a anfetamina e cocaína  
CAT - Catalase  
CGI-58 – Identificador de Comparativo Genético 58  
DM 2 – Diabetes Mellitus tipo 2  
DHL – Dieta Hiperlipídica  
eIF4G - Fator de iniciação eucariótica  
EO – Estresse Oxidativo  
FAS – Acido Adiposo Sintase  
FOXO 1 – Fator de transcrição  
GLUT4 – Transportados de glicose tipo 4  
GPx – Glutathione Peroxidase  
GSK-3 - Glicogênio sintetase quinase 3  
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante a insulina  
IKK (*IkappaB kinase*) - Complexo enzimático com atividade serina-quinase  
IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$   
IL-6 - Interleucina 6  
IMC – Índice de Massa Corporal  
IR (Insulin Receptor) - Receptor de Insulina  
IRS 1-2 (Insulin Receptor Substrate) - Substrato Receptor de Insulina 1-2  
JAK 2 – Janus Quinase 2  
JNK – proteínas Jun N-terminal quinase  
mRNA – RNA mensageiro  
mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) - Proteína alvo de rapamicina  
NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*) - Fator de transcrição kappa B.  
NPY – Neuropeptídeo Y  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PAI-1 - inibidor-1 do ativador do plasminogênio  
PCG1b – Proliferador ativado de peroxissoma gamma receptor  
coativador 1-beta



PGC1 $\alpha$  – Proliferador ativado de peroxissoma gamma receptor  
coativador 1-alfa  
PI3-K - Fosfatidilinositol 3-quinase.  
PKC – Proteína quinase C  
POMC – Pró-opiomelanocortina  
PTP-1B(*Protein Tyrosine Phosphatase 1B*) - Proteína Tirosina Fosfatase 1B  
RL – Radicais Livres  
SOCS-3 – Supressor de sinalização de citocinas 3  
SOD – Superóxido Dismutase  
STAT 3 – Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3  
TAG – Triacilglicerol  
TBARS – Espécies Reativas a Acido Tiobarbitúrico  
TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alfa*) - Fator de necrose tumoral  $\alpha$ .





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sinalização de fome e saciedade no hipotálamo.....	25
Figura 2: Via da sinalização celular da insulina.....	28
Figura 3: Ação celular da resposta anti-inflamatória da adiponectina .....	30
Figura 4: Ações oxidantes e antioxidantes na célula.....	32
Figura 5: Mecanismos da síntese de ERO durante e após exercícios aeróbios .....	35
Figura 6: O papel do exercício físico no processo de resistência à insulina .....	37
Figura 7: Representação esquemática do mecanismo molecular modulados pelo exercício físico.....	39



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>23</b>
2.1 OBESIDADE	23
2.2. ASPECTOS MOLECULARES E BIOQUÍMICOS	24
<b>2.2.1 Via da insulina</b>	<b>26</b>
<b>2.2.2. Estresse oxidativo</b>	<b>31</b>
2.3. EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO	33
2.4. EXERCÍCIO FÍSICO E SINALIZAÇÃO	36
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
5.1 A CONTRIBUIÇÃO DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS EXPOSTOS A DIETA HIPERLIPÍDICA	48
5.2 A CONTRIBUIÇÃO DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM DIFERENTES TECIDOS DE ANIMAIS EXPOSTOS A DIETA HIPERLIPÍDICA	56
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>67</b>
<b>PERPECTIVAS</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>85</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde pública que atinge indivíduos de todas as classes sociais e em todas as faixas etárias. Está relacionada a fatores metabólicos, genéticos, baixos níveis de aptidão física, hábitos alimentares, condições socioeconômicas e comportamentais, (VIUNUSKI, 1994; SALBE e RAVUSSIN, 2002; NELSON et al., 2007).

Durante as últimas décadas tem sido descrito que o tecido adiposo não é somente um órgão de armazenamento de gordura, mas é também um órgão com atividade endócrina, com funções importantes regulando tanto a inflamação como o metabolismo energético (LUCA, 2008; FRANSSEN et al., 2008). As modificações metabólicas, associadas às mudanças na expressão gênica 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), sugerindo a participação de fatores de transcrição, mediadores inflamatórios e formação de radicais livres (RL) no desenvolvimento da obesidade.

As vias de sinalização celular e modificações metabólicas relacionadas à obesidade, a resistência a insulina e a produção de RL estão bem descritas na literatura, no entanto a aplicação de métodos terapêuticos para controle e tratamento necessita de mais investigações. Uma dieta hiperlipídica e consequentemente obesidade podem prejudicar as vias de sinalização celular da mesma forma que estimular a produção de RL com efeitos negativos à saúde (CINTRA et al., 2001).

Diante disso, vários estudos são conduzidos com o objetivo de compreender os mecanismos moleculares e bioquímicos em tecidos periféricos, relacionando a obesidade às intervenções terapêuticas ou preventivas. O exercício físico tem sido considerado como um importante recurso para prevenir ou auxiliar no tratamento de diversas doenças como a obesidade devido ao aumento do gasto energético diário, além de contribuir para a melhora da sinalização celular e do sistema antioxidante. (ROPELLE et al., 2006; PAULI et al., 2009; PAULI et al., 2010)

Estudos que utilizam animais (ratos e camundongos) tendo o exercício como forma terapêutica primeiramente induzem a obesidade para posteriormente submeter ao tratamento e procedimentos com

exercício físico, farmacológicos, entre outros. No presente estudo, foi utilizado um protocolo de treinamento físico concomitante com exposição à dieta hiperlipídica, com o objetivo de avaliar os efeitos e a efetividade do exercício físico como um método preventivo e protetor no desenvolvimento da obesidade, na diminuição da resistência à insulina e produção de RL.

No ponto de vista bioquímico, tem-se como hipótese que o exercício físico pode contribuir para a prevenção do ganho de peso, com isso diminuir a produção de ERO decorrentes do aumento de peso, aumentando a lipólise por meio da estimulação da ATGL e CGI-58 na hidrólise do triacilglicerol. Já para as vias moleculares, a hipótese é que o exercício possa também contribuir para prevenção do ganho de peso, diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a anti-inflamatórias como a adiponectina uma das responsáveis pelo aumento da sensibilidade a insulina em tecidos periféricos.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 OBESIDADE

O aumento do peso corporal e consequentemente a obesidade tem se tornado o maior problema de saúde da população ocidentalizada, necessitando urgentemente a identificação e a direção para a prevenção, controle e tratamento. Estudos demonstram que a prevalência da obesidade sofre grandes variações, que vão desde menos de 1% na Índia, 2,4% na Indonésia, 2,9% na China para 32% nos Estados Unidos, 22,7% no Reino Unido e 16,4% na Austrália, em adultos de todas as faixas etárias (LOOW et al., 2009).

No ano de 2008 eram aproximadamente 1,5 bilhões de adultos no mundo com mais de 20 anos acima do peso ( $IMC = 25-29,9 \text{ kg/m}^2$ ) e mais de 500 milhões com obesidade ( $IMC >30 \text{ kg/m}^2$ ). Estima-se que em 2015 serão aproximadamente 2,3 bilhões de pessoas com sobrepeso e 700 milhões de obesos em todo o mundo, o que remete a um agravante na saúde da população (BLAKEMORE et al., 2008; OMS, 2010).

No Brasil, o sobrepeso e a obesidade também têm sido apresentados como um problema de saúde pública. Os últimos inquéritos populacionais realizados no país têm demonstrado um aumento expressivo do problema. A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008 e 2009 revelou crescimento rápido e expressivo do sobrepeso em todas as regiões brasileiras desde 1974.

Em 35 anos, sua prevalência entre homens quase triplicou de 18,5% para 50,1%, já nas mulheres o aumento foi menor, de 28,7% para 48%. Em relação à obesidade os homens aumentaram de 2,8% para 12,4% e nas mulheres de 8% para 16,9% (IBGE, 2010). Dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (2010) confirmam o crescimento destes números no conjunto da população adulta. Foram investigadas 27 cidades brasileiras (26 capitais brasileiras e o Distrito Federal), com 48,1% e 15,0% para a frequência do sobrepeso e obesidade, respectivamente.

A preocupação com o aumento da incidência da obesidade está presente também em outras populações, como crianças e jovens. Segundo dados da OMS (2010), cerca de 42 milhões de crianças estão com obesidade em todo o mundo. Destes, 35 milhões vivem em países em desenvolvimento. No Brasil, estima-se haver cerca de 6 milhões de crianças e adolescentes acometidos pela doença (GARCIA et al., 2010).

Farias Júnior e Silva (2008) em seu estudo na cidade de João Pessoa/PB observou que um a cada dez escolares do ensino médio



(10%) apresentaram excesso de peso corporal (sobrepeso/obesidade), mostrando-se mais elevado nos meninos (13,5%) do que nas meninas (7,4%). Baseado nestes dados a previsão para 2020 é de 30% a 37% dos meninos e 34% a 44% das meninas com sobrepeso, necessitando de ações de prevenção, controle e tratamento deste problema, pois várias são as complicações decorrentes da obesidade na infância ou adolescência (FISBERG, 2005; FRANSSEN et al., 2008).

Devido aos números apresentados e com uma incidência cada vez maior nacional e mundialmente, a obesidade pode ser considerada como uma pandemia, aumentando a incidência de doenças crônicas (OGDEN et al., 2006; LENZ et al., 2009).

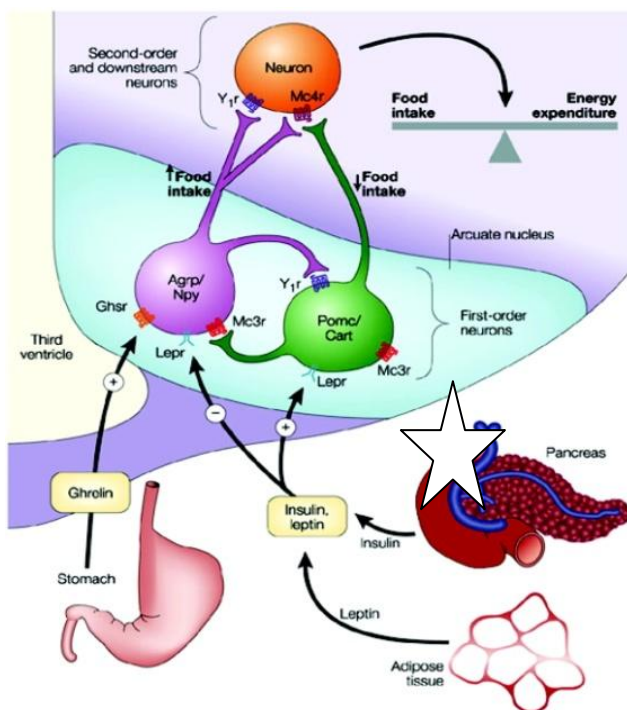
Referente aos custos desta doença, no Brasil os gastos com a obesidade e agravos à saúde é de aproximadamente R\$ 1,1 bilhão por ano com internações hospitalares, consultas médicas e medicamentos. Desse valor, R\$ 600 milhões são originários do Sistema Único de Saúde (SUS) e equivalem a 12% do que o governo brasileiro despende anualmente com todas as outras doenças. Se os gastos indiretos (absenteísmo, licenças médicas e mortes prematuras) forem levados em consideração, esses gastos elevam-se a R\$ 1,5 bilhão por ano (SICHERI et al., 2003, apud PORTO et al., 2007).

## 2.2. ASPECTOS MOLECULARES E BIOQUÍMICOS

Pesquisadores no mundo todo estão desenvolvendo estudos na tentativa de identificar as possíveis causas de desenvolvimento da obesidade. O grande passo foi a descoberta que o tecido adiposo é um órgão endócrino, capaz de produzir e liberar substância no organismo humano, com produção anormal de adipocina e a ativação de algumas vias de sinalização pró-inflamatórias relacionadas à doença (HOTAMISLIGIL et al., 1993; BASTARD et al., 2002; SARTIPY et al., 2003). Com isso, novas pesquisas foram iniciadas para identificar quais estão intimamente relacionadas à obesidade e outras doenças, sendo relatadas algumas como o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), resistina, adiponectina, IL-6 (interleucina 6), PAI-1 (inibidor-1 do ativador do plasminogênio), leptina, AGL (Ácido Graxo Livre), angiotensinogênio, visfatina, IL-1 (interleucina 1), entre outros. Foi descoberto que à medida que o adipócito aumenta o seu tamanho ou quantidade aumenta também a produção e liberação destas citocinas, como consequência o aumento do peso corporal (JELLEMA et al., 2004).

Em nível cerebral o centro de sinalização, especificamente no hipotálamo é estimulado pela leptina e insulina e ativa tanto a via POMC/CART (Pró-opiomelanocortina/Transcrição relacionada à anfetamina e cocaína) como via NPY/Agrp (Neuropeptídeo Y/Proteína relacionada Agouti), dependendo especificamente de dois fatores, o estado energético ou deficiência em uma das vias moleculares, que podem prejudicar a transdução do sinal de fome ou saciedade. (EL-HASCHIMI, 2000; FOSTER-SHUBERT & CUMMINGS, 2006).

Figura 1: Sinalização de fome e saciedade no hipotálamo



Fonte: (adaptado) de Foster-Schubert, K. E. et al. *Endocr Rev* 2006; 27:779-793

Outro fator importante no desenvolvimento da obesidade é a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), uma vez que o tecido adiposo de animais e humanos obesos sofrem ações de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, que aumentam a produção local de citocinas pró-inflamatórias que concomitantemente elevam a produção de ERO. Dessa forma, a inflamação e o estresse

oxidativo no tecido adiposo induzem mudanças importantes na expressão gênica do adipócito, no metabolismo lipídico e no conteúdo do adipócito (ESPIRITU e MAZZONE, 2008).

Um dos principais mecanismos envolvendo a produção de ERO sobre a obesidade é modificação oxidativa de lipoproteínas circulatórias, particularmente a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade. A lipoproteína de baixa densidade quando oxidada é capturada por macrófagos e forma células espumosas carregadas de colesterol (ANTONIADES et al., 2003).

De acordo com Stefanovic et al. (2008), a obesidade também pode induzir estresse oxidativo sistêmico, devido ao aumento na produção de RL na gordura acumulada e consequente redução da capacidade do sistema de defesa antioxidante. Isso prejudica o consumo de glicose no músculo e no tecido adiposo e diminui a secreção de insulina pelas células *B* pancreática. A interação entre adipócitos e pró-oxidante sugerem que a redução da inflamação e estresse oxidativo aumentam expressão de apoE no adipócito, aumentando as ERO (ESPIRITU e MAZZONE, 2008).

### **2.2.1 Via da Insulina**

A sinalização da insulina ocorre primeiramente após sua ligação a um receptor de membrana específico com atividade quinase intrínseca, que promove uma cascata de sinalização, alterando a atividade celular resultando no transporte da glicose por diversas vias.

Hormônios como a insulina tem relação com a obesidade. Uma vez secretada pela célula *B* do pâncreas, cuja síntese é ativada primariamente pelo aumento dos níveis circulantes de glicose, e modulada também por aminoácidos e ácidos graxos, além dos estímulos neurais, age em diferentes tecidos, incluindo fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, proporcionando efeitos metabólicos imediatos como o aumento na captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose, da proteólise e da lipólise, entre outros (SALTIEL & KAHN, 2001).

Do ponto de vista funcional, quando relacionada obesidade, a insulina estimula o armazenamento de substratos no adipócito, o que por sua vez leva a um aumento na expressão e secreção de leptina por este tecido. A leptina agindo no hipotálamo aumenta a termogênese e inibe o apetite (FRIEDMAN & HALAAS, 1998; SHIMIZU et al., 2007). Por outro lado, quando age na ilhota pancreática reduz a secreção de

insulina, dessa forma insulina e leptina participam de um sistema de controle endócrino em que o objetivo principal é o de manter os estoques controlados de energia, além de regular os níveis circulatórios do principal substrato de uso imediato, a glicose (KRAEMER et al., 2002).

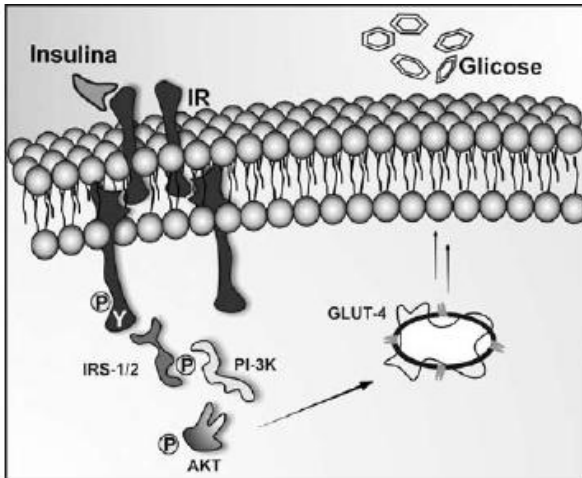
No hipotálamo parece existir uma inter-relação entre as vias de sinalização da leptina e insulina, iniciando sua sinalização pela via da Janus Quinase (JAK) e Transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT-3). Tanto a leptina como a insulina são capazes de induzir a ativação do JAK-2 e a fosforilação do STAT-3. Assim se conclui que o hipotálamo, na via JAK-2/STAT-3, é controlado em primeiro lugar pela leptina, sofrendo uma modulação incrementada pela insulina (CARVALHO-FILHO, 2005).

Além disso a sinalização pode ocorrer na via do substrato do receptor de insulina (IRS) e fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K). Estudos mostram que neste caso o efeito da insulina predomina sobre a leptina, na qual provoca uma maior ativação do PI3K. Em consequência, um maior ritmo dos disparos neuronais e a leptina então desempenha um papel potencializador (DE SOUZA et al., 2005; PAULI et al., 2009).

A sinalização da insulina inicia com a ligação intracelular a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, denominado Receptor de Insulina (IR) (KASUGA et al., 1982; SALTIEL & KAHN, 2001). A ativação do IR resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e 2 (IRS-2). A fosforilação das proteínas IRSs cria sítios de ligação para outra proteína citosólica denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), promovendo sua ativação.

A PI3-K é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e efeitos metabólicos estimulados pela insulina (SAAD et al., 1993). A fosforilação dos sítios de tirosina das proteínas IRSs ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3-K ativa o sítio catalítico associado (BACKER et al., 1992). A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol, produzindo fosfatidilinositol-3 fosfato, fosfatidilinositol-3,4 difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato. A ativação da PI -3-K aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (AKT).

Figura 2: Via da sinalização celular da insulina



Fonte: (adaptado) Pauli et al., Arq Bras Endocrinol Metab. 2009;53/4

Foi demonstrado que a ação das proteínas relacionadas a PI3K também tem ações importantes no controle da fome. A PI3K ativa a Akt (Proteína Quinase B) e promove a fosforilação da FKHR (fator de transcrição), uma proteína da superfamília dos fatores de transcrições *Forkhead* (BRUNET, 1999). Estas proteínas podem regular expressão de genes envolvidos em apoptose, ciclo celular, reparo de DNA, estresse oxidativo, longevidade e controle de crescimento (CHOW, 2010).

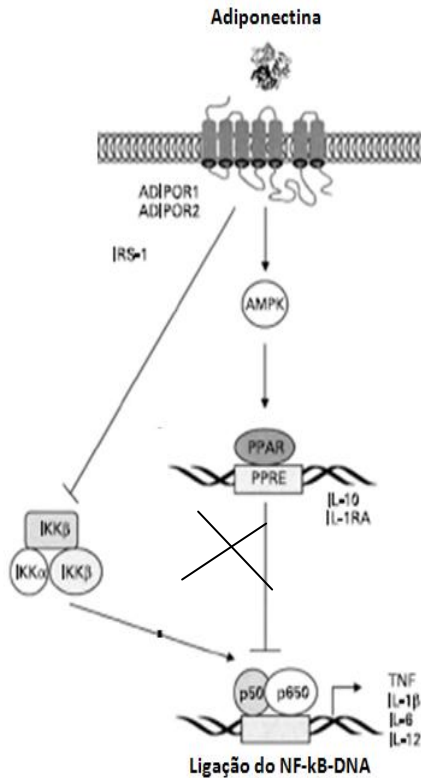
A FOXO1 (fator de transcrição) modula as ações da insulina, incluindo a termogênese, a oferta de glicose e músculo esquelético. A diferença dos dois adipócitos é o crescimento das células B pancreáticas. Os efeitos periféricos da FOXO1 são a regulação da sinalização da insulina no hipotálamo e na gordura corporal, controlando ambos os circuitos (OGG et al., 1997; BJORBAEK et al., 1997).

A adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória, tem efeito sistêmico, e sua concentração plasmática está inversamente relacionada com a massa de tecido adiposo e ao Índice de Massa Corporal (IMC) (GIL-CAMPOS et al., 2004). Esta adipocina aumenta a sensibilidade à insulina, no músculo esquelético e no tecido adiposo (GIL CAMPOS et al., 2004; LARA-CASTRO et al, 2007), tem efeitos anti-inflamatórios sobre as células do sistema imunológico (WULSTER-RADCLIFFE, 2004), e reduz a formação de placa de ateroma. Portanto, a diminuição da concentração de adiponectina no plasma pode estar associada com

aumento do quadro inflamatório, com a diminuição na sensibilidade à insulina e problemas cardiovasculares, frequentemente observados em obesos (SCHOBER et al., 2007).

Até o momento, três receptores de adiponectina foram identificados, AdipoR1, AdipoR2 e mais recentemente a T-caderina. AdipoR1 e AdipoR2 são receptores com sete domínios transmembrana. O AdipoR1 exibe expressão elevada no músculo esquelético, tanto em humanos quanto em camundongos. Em contraste, o AdipoR2 é expresso no fígado do rato e no fígado e músculo esquelético humano, a T-caderina, embora seja um receptor truncado que não tem o domínio intracelular necessário para a transdução de sinal, pode participar da cascata de sinalização intracelular, competindo com AdipoR1 e AdipoR2 (BROCHU-GAUDREAU et al., 2010). A ação da resposta anti-inflamatória da adiponectina está exemplificada na Figura 3.

Figura 3: Ação celular da resposta anti-inflamatória da adiponectina



Fonte: (adaptado) Brochu-Gaudreau et al., Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 37: 11-32. 2010

Esta adipocina aumenta a sensibilidade à insulina e tem efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos. Diminuição das concentrações de adiponectina sérica tem sido observada em indivíduos com resistência à insulina, obesidade, DM2 e doença cardíaca (HOTTA et al., 2000).

As concentrações séricas de adiponectina são inversamente correlacionadas com o índice de adiposidade central, pressão arterial, glicemia de jejum, resistência à insulina e concentrações séricas de insulina (YAMAMOTO et al., 2002). Foi também demonstrado que adiponectina reduz a produção hepática de glicose e a concentração de triacilglicerol no músculo esquelético, assim melhorando a sensibilidade à insulina (PRINS, 2002).

Outras citocinas estão relacionadas à obesidade e ao DM2, como os níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 que modulam a resistência à insulina através de vários mecanismos distintos, incluindo JNK1, fosforilação em serina no IRS-1, complexo I $\kappa$ b kinase (IKK), NF- $\kappa$ B e a indução e ativação de supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS-3) (TILG & HOTAMISLIGIL, 2006). Desta forma, a ativação da resposta imune na obesidade é mediada por vias de sinalização específica, com o complexo enzimático com atividade serina quinase (JNK e IKK). Estes eventos podem modificar a sinalização de insulina e resultar no desenvolvimento de resistência à insulina (KARALIS et al., 2009).

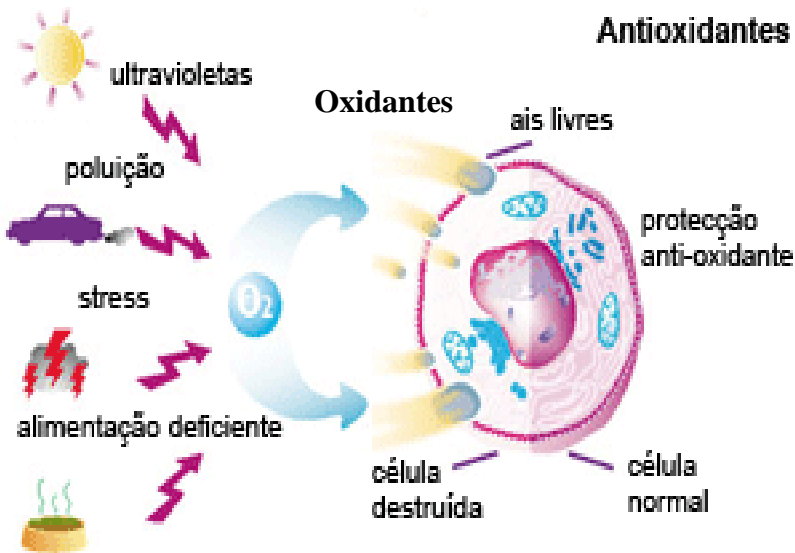
### **2.2.2. Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo é um fenômeno bioquímico que ocorre a partir de um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de oxidantes (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007). É uma manifestação bioquímica de agressão a biomoléculas e está associado a diversas complicações cardiovasculares, neurológicas, endócrinas e musculares, entre várias outras (VAZIRI, 2004). Estudos comprovam que o estresse oxidativo está relacionado com o envelhecimento, atividade física intensa, apoptose, câncer, diabetes mellitus e arteriosclerose. A ocorrência de um estresse oxidativo moderado frequentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres (RL) pode causar danos e morte celular (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007).

Os RL são moléculas ou fragmentos moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na órbita mais externa e possuem uma vida média muito curta (medida em microssegundos). Buscam sua estabilidade química extraindo elétrons de moléculas estáveis (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007). Em nosso organismo, os RL são produzidos naturalmente agindo como mediadores de funções celulares no combate de outros agentes. Porém, quando produzido em excesso, além da capacidade celular de defesa antioxidante, podem oxidar biomoléculas e provocar sérios efeitos deletérios ao organismo.



Figura 4: Ações oxidantes e antioxidantes na célula



Fonte:(adaptado) Nutrição (2012)

As EROs são moléculas produzidas durante o metabolismo normal de oxigênio e têm um importante papel na homeostase e sinalização celular. O envolvimento de ERO com a fisiopatologia da obesidade é sugerida devido à formação em excesso nas células adiposas, levando a mudanças significativas na expressão gênica do adipócito, no metabolismo dos lipídeos e no conteúdo dos adipócitos, acompanhado pelo aumento nos níveis de NADPH oxidase e diminuição das defesas antioxidantes.

Para Stefanovic et al. (2008), a obesidade por si só pode induzir o aumento da ERO local e sistêmica, principalmente a mudança no estado redox e da célula adiposa, e com isso reduzir a capacidade do sistema de defesa antioxidante, prejudicando o consumo de glicose no músculo e no tecido adiposo. Adicionalmente diminui a secreção de insulina pelas células *B* pancreática e por consequência a resistência à insulina.

Lípase hormônio sensível (HSL) é uma enzima chave na regulação lipídica, e estoque de energia corporal. Recentemente foi proposto que a HSL pode ser um alvo terapêutico interessante contra a obesidade devido a seu papel crucial na lipólise. A via lipolítica foi descrita há algum tempo, no entanto ainda não está completamente

elucidada. ERO são mediadores importantes para a regulação da lipólise, particularmente positiva entre ERO e lipólise na obesidade estimulada pela glicose na secreção da insulina, sendo assim, ERO pode ser um modulador da lipólise no adipócito (KRAWCZYK et al., 2012).

A lipólise pode ser compreendida como o consumo de energia maior que o necessário, em que animais estocam este excesso de energia em forma de triglicerol nos adipócitos, podendo ser hidrolisado e os AGL serão utilizados como fonte de energia em vários tecidos. Uma das proteínas envolvidas na lipólise é a HSL, e neste contexto um dos componentes cruciais envolvidos e identificado foi a CGI-58 que é formalmente expressada através de tecido adiposo relativamente abundante, quando induzido para a diferenciação celular.

Na estimulação lipolítica com catecolaminas, CGI-58 é rapidamente liberada para dentro do citosol, provavelmente por fosforilar a perilipina (YAMAGUCHI, 2001). A triglicerol lipase do tecido adiposo (ATGL) é a responsável pela lipólise no adipócito, e por muitos anos foi descrito que a HSL é a maior responsável pela degradação de triacilglicerol no adipócito. No entanto, outras lipases foram descobertas como responsáveis pela hidrólise do triacilglicerol, e a ATGL foi identificada por vários grupos de pesquisadores, sendo expressa predominantemente no tecido adiposo e catalizado por hidrólise do triacilglicerol para diacilglicerol e ácido graxo (YAMAGUCHI, 2001).

### 2.3. EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO

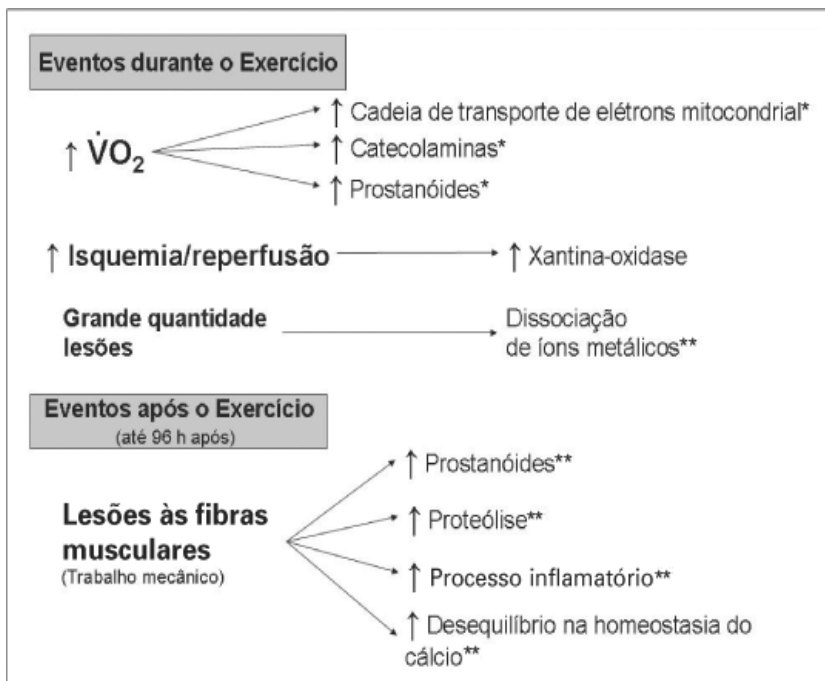
Embora o exercício físico de forma aguda aumente o consumo de  $O_2$  pelos tecidos ativos e concomitantemente aumente a produção de RL (COOPER et al., 2002; CAZZOLA et al., 2003; ZOPPI et al., 2003), concomitantemente, eleva a produção de RL (ALESSIO & GOLDFARB, 1988). O treinamento realizado com intensidades leve a moderada pode diminuir a produção de ERO e aumentar as defesas antioxidantes, contribuindo para o equilíbrio fisiológico do sistema oxidante-antioxidante (CHILDS et al., 2001; MASTALLOUDIS et al., 2004; PINHO et al., 2006). Durante o exercício físico, as taxas metabólicas são elevadas e podem aumentar drasticamente o consumo de oxigênio ( $VO_2$  Max) em 20 vezes com relação aos valores de repouso e em 100 vezes na fibra muscular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Estudos têm demonstrado que o treinamento físico de intensidade moderada aumenta as defesas antioxidantes e a resistência

do tecido músculo esquelético (ALESSIO & GOLDFARB, 1988; RADÁK et al., 1999; GOMEZ-CABRERA et al., 2006; PINHO et al., 2006). Vários mecanismos de produção de ERO estão diretamente relacionados com exercício físico, dentre os quais se destacam o aumento da produção de ânion superóxido na cadeia transportadora de elétrons, a ativação de células polimorfonucleares e em processos de isquemia/reperfusão (GOMEZ-CABRERA et al., 2006).

O exercício leva à formação de várias células do sistema imune, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, que são capazes de produzir ERO para destruir agentes invasores e remover tecidos danificados. Entre essas células, os neutrófilos são a maior fonte de ERO ( $O_2^-/H_2O_2$ ) pela reação da NADPH-oxidase. A quimiotaxia, embora seja uma reação desejável, quando não bem regulada, pode ser uma das causas de inflamações agudas devido ao aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) e prostaglandinas, levando à indução e à intensificação de processo inflamatório adicional (MASTALOUDIS et al., 2004).

Figura 5: Mecanismos da síntese de ERO durante e após exercícios aeróbios



Fonte: (adaptada) Revista Brasileira Medicina no Esporte (2007)

Durante o trabalho muscular isquêmico a xantina oxidase (XO) catalisa a degradação do monofosfato de adenosina (AMP), levando ao aumento na produção de  $O_2^-$ . Durante a isquemia, o AMP é degradado para hipoxantina. A XO é reduzida para xantina desidrogenase durante a isquemia por proteases. A XO converte a hipoxantina para xantina e ácido úrico, usando o  $O_2$  como receptor de elétrons, formando assim o  $O_2^-$ .

Entretanto, mesmo que o exercício intenso induza uma alteração significativa na produção de ERO, estudos mostram que o exercício físico regular de endurance pode tornar mais eficiente o sistema de defesa antioxidante e melhorar a capacidade oxidativa dos sistemas orgânicos, estabelecendo um equilíbrio entre os danos induzidos pelas ERO e os sistemas de reparos antioxidantes (ALESSIO & GOLDFARB, 1988; RADÁK et al., 1999).

EROs estão envolvidas em alguns processos essenciais à vida humana e também são fundamentais nos efeitos de danos e na adaptação que acompanham o exercício físico (SACHDEV et al., 2008). Os efeitos positivos do exercício físico sobre o estresse oxidativo estão relacionados à sua capacidade de aumentar o sistema antioxidante e de regular o estado redox da célula (PINHO et al., 2010). Vários mecanismos de sinalização são ativados para a manutenção do equilíbrio celular entre oxidante/antioxidante em resposta ao exercício físico, envolvendo fatores de transcrição, como NFRZ e NF- $\kappa$ B. Assim sendo, a produção de ERO pelo exercício inicia uma cascata de eventos intracelulares que pode ser a abertura para a expressão gênica de enzimas antioxidantes.

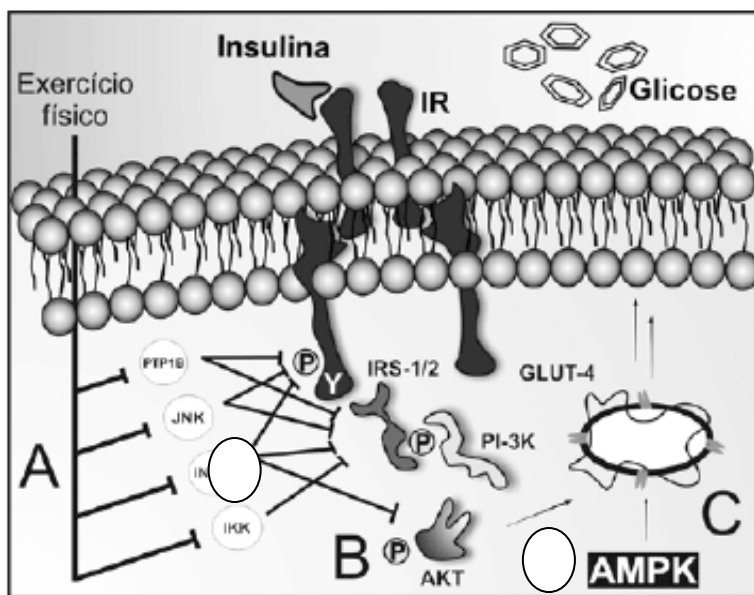
#### 2.4. EXERCÍCIO FÍSICO E SINALIZAÇÃO

O exercício físico é considerado um mecanismo eficaz na prevenção e tratamento de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis, pois o dispêndio promovido pelo exercício contribui para a redução de peso e controle de outras doenças. Em condições fisiológicas, o exercício físico e a insulina são estimuladores do transporte de glicose no músculo com a ativação IR (PAULI et al., 2009).

Estudos realizados com animais demonstraram que o exercício físico altera a expressão e a atividade das proteínas implicadas na transcrição do sinal da leptina e insulina, estimulando a fosforilação das proteínas IRS-1 e IRS-2, assim como as associações destes substratos com a PI3K além disso a fosforilação hipotalâmica da Akt é menor em animais sedentários que em animais que praticam exercício (PRADA et al., 2007).

Ao nível hipotalâmico a insulina demonstra um aumento da sensibilidade pela ação tanto da leptina como da insulina em animais submetidos a exercício físico, com hipótese que o exercício pode ter ações supressoras do apetite pela via hipotalâmica da PI3K (CINTRA et al., 2007).

Figura 6: O papel do exercício físico no processo de resistência à insulina



Fonte: PAULI et al.(2009)

O exercício agudo parece ser capaz de aumentar a fosforilação em tirosina da subunidade beta do receptor de insulina (IR $\beta$ ) e aumentar a fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) estimulado por insulina (HENRIKSEN, 2002). O exercício potencializa também o efeito da insulina na fosforilação do substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2) com conseqüente aumento da atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K) (ROPELLE et al., 2008). Além disso, ocorre também uma maior fosforilação em serina da Akt, proteína fundamental para iniciar a translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a membrana citoplasmática (WOJTASZEWSKI et al., 1999, LUCIANO et al., 2002). A diminuição do peso corporal pelo exercício é relacionada com a ativação do metabolismo mitocondrial, que tem sido relacionado a DM2 e produção de ERO.

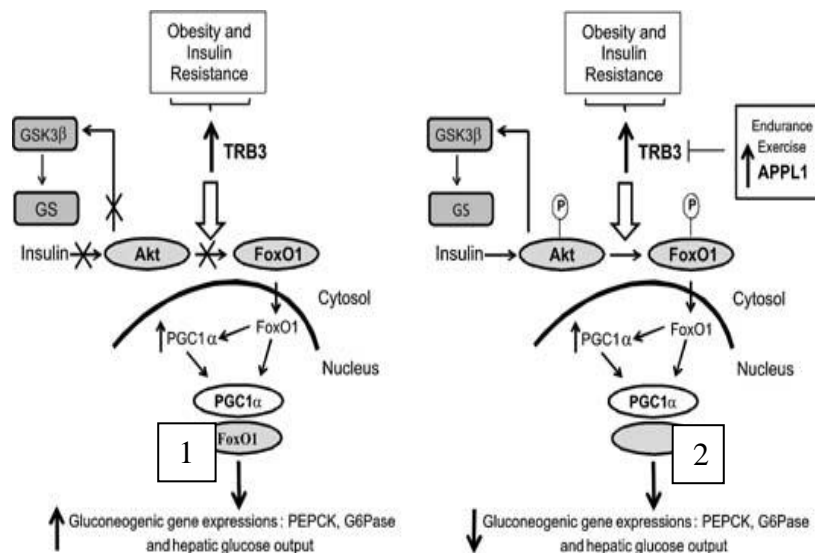
Estudos demonstraram que uma única sessão de exercício físico melhora o metabolismo de glicose em jejum em camundongos diabéticos, invertendo a resistência à insulina no músculo esquelético e tecido hepático. O efeito do exercício na ação da insulina pode ser

devido à redução da fosforilação do IRS-1 em serina, mecanismo pelo qual uma única sessão de exercício pode aumentar a captação de glicose no músculo e diminuir a produção de glicose pelo fígado, melhorando a homeostase da glicose em pacientes com DM2.

Portanto, fica evidente que o treinamento físico pode ser utilizado como uma terapia para melhorar a sensibilidade à insulina. No entanto, é pouco conhecida a associação entre a adiponectina e os efeitos benéficos do exercício físico. Estudos de Huang et al., (2006) têm examinado quais os efeitos do treinamento físico na concentração de adiponectina plasmática.

No entanto, estudos não indicam mudanças significativas na concentração de adiponectina plasmática após o treinamento físico, talvez pela característica dos sujeitos, protocolos de treinamento ou intensidade do exercício (HULVER et al., 2002). Em adição a isso, os estudos que reportaram inibição na expressão de AdipoR demonstram uma diminuição no consumo da glicose em vitro, sugerindo que o efeito proposto da adiponectina na homeostase da glicose em humanos pode ser em parte regulado pelo nível de expressão do receptor de adiponectina (YAMAUCHI et al., 2003).

Figura 7: Representação esquemática do mecanismo molecular modulados pelo exercício físico.



Fonte:(adaptado) Marino et al. (2012)

Ambos os exercícios, crônico ou agudo, têm efeito no consumo e disponibilidade de glicose com implicações importantes para indivíduos com diabetes em termos de controle metabólico crônico e regulação aguda da homeostase da glicose (MARINO et al., 2012). O mecanismo molecular associado à sensibilidade à insulina por meio do exercício físico está relacionado à ativação de proteínas-chave para a regulação do metabolismo da glicose, como por exemplo a APPL1 mediada pela Akt, que ativada pela insulina resulta na modificação da fosforilação da GSK3B e aumento no acúmulo de glicogênio no fígado de ratos (CHENG et al., 2009a).

Estudo realizado por Marinho et al. (2012) demonstra que após longos períodos de exercício físico a síntese de glicogênio constitui uma prioridade nos músculos exercitados durante a recuperação, e que o treinamento físico aumenta acentuadamente a expressão da proteína APPL1 e redução de TRB3, diminuindo o diabetes através da ativação de Akt em camundongos obesos, independentemente da perda de peso. Os efeitos positivos do exercício na ação da insulina são reforçados por estudos demonstrando que ratos treinados apresentam altos níveis de fosforilação da Foxo1. No entanto não está bem descrita a relação entre



o aumento da expressão da APPL1 no tecido hepático de animais obesos submetidos ao treinamento físico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a contribuição do treinamento físico nos parâmetros de estresse oxidativo, vias de sinalização e resistência à insulina em tecidos periféricos de animais expostos a dieta hiperlipídica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos do exercício físico sobre os níveis proteicos de FAS, ATGL e CGI-58;
- b) Avaliar os efeitos do exercício físico sobre dano oxidativo em gordura visceral de animais expostos a DHL;
- c) Avaliar os efeitos do exercício físico sobre a produção de enzimas antioxidantes em gordura visceral de animais expostos a DHL;
- d) Avaliar os efeitos do exercício físico sobre o processo lipolítico em gordura visceral de animais expostos a DHL;
- e) Avaliar os efeitos do exercício físico na atividade e expressão da via de sinalização IR, IRS 1, Akt, AdipoR1-2 e APPL1 no tecido adiposo;
- f) Avaliar os efeitos do exercício físico na atividade e expressão da via de sinalização IR, IRS 1, Akt, AdipoR1-2 e APPL1 no músculo esquelético;
- g) Avaliar os efeitos do exercício físico na atividade e expressão da via de sinalização IR, IRS 1, Akt, AdipoR1-2 e APPL1 no fígado.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

**Amostra:** Foram utilizados 24 camundongos machos, (Swiss) com idade de 2 meses, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Santa Catarina, Brasil. Imediatamente após o recebimento, os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=6), sendo: grupo 1 (dieta padrão); grupo 2 (dieta padrão+exercício); grupo 3 (dieta hiperlipídica); grupo 4 (dieta hiperlipídica+exercício). Os animais foram mantidos em ciclo de luz controlado de 12hs. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com Lei nº 11.794/08, aprovado pelo comitê de ética da UNESC sob o protocolo de 89/2009.

**Dieta e protocolo de treinamento físico:** Os animais com dieta padrão foram alimentados com ração comercial padrão para roedores da Nuvital (*ad libitum*) e a constituição da dieta hiperlipídica foi utilizada de acordo com Noeman et al., (2011). Todos os animais tiveram acesso livre a água e comida durante os 90 dias. Os animais foram submetidos diariamente ao treinamento físico na água (2x30 minutos com 5-minutos de intervalo), em cinco dias por semana por 12 semanas. O treinamento foi conduzido em uma piscina de 120 x 60 x 50 cm com raias de 10 x 15 x 50 cm e profundidade de 37.5 cm<sup>3</sup> a temperatura da água foi controlada em 30-32°C, (tabela 01).

**Controle do peso e treinamento:** O peso corporal foi mensurado no início e imediatamente após a última sessão de treinamento utilizando uma balança de precisão semi-analítica (Gehaka modelo BK300, precisão 0.01g). A intensidade de treinamento foi controlada pelo nível de lactato sanguíneo. Antes e imediatamente após da primeira e da 20<sup>a</sup> sessão de treinamento, aproximadamente 25-µL de amostra de sangue foram coletadas da veia caudal dos animais para mensurar o lactado utilizando o lactímetro (Accusport). O grupo controle foi submetido somente a uma sessão de treinamento para uma amostra única de lactato.

**Eutanásia:** 48 horas após a última exposição ao treinamento, os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de tiopental de sódio (40 mg. kg<sup>-1</sup>). Em todo o experimento, a propriedade da anestesia foi testada pela evolução da perda dos reflexos pedal e corneano, através do procedimento experimental. Após os procedimentos experimentais, os camundongos foram mortos utilizando anestesia (tiopental 200 mg.kg-1), seguindo as recomendações da

publicação NIH n.85-23. O fígado, gastrocnemio e tecido adiposo de região visceral (gordura epididimal) foram retirados cirurgicamente. Uma alíquota dos tecidos foi homogeneizado em tampão específico e usado para análises bioquímicas e proteicas intracelulares por western blot. O restante do material foi armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise posterior.

***Homogeneização da amostra por western blotting:*** Para a análise molecular da amostra foram homogeneizadas em tampão contendo 1% Triton X 100, Tris 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM EDTA mM 100, vanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,1 mg / mL a  $4^{\circ}\text{C}$ . O homogeneizado foi então centrifugado a 11.000 rpm por 40 min. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína, de acordo com um método de Lory et al., (1991). Posteriormente, o extrato total foi determinado no mesmo material, utilizando um anticorpo específico.

***Western blotting:*** Alíquotas contendo 250 mg de proteína (por amostra) foram aplicadas em 1,5 mm de espessura em gel de poliácridamida. Eletroforese foi conduzida em uma célula minigel (Bio Rad, Mini-Protean), com tampão de eletroforese previamente diluída. SDS-PAGE foi inicialmente conduzida a 25V (sobre o gel de empilhamento) e 120V (até o final do gel de resolução). Em seguida, as proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um dispositivo minigel electrotransference (Bio Rad) e da solução tampão foi mantido em 120V por 2h sob refrigeração contínua com gelo. Membranas de nitrocelulose contendo as proteínas de execução foram incubadas em solução bloqueadora por 2h em temperatura ambiente para reduzir a ligação de proteínas não específicas. Então, as membranas foram lavadas três vezes (10 min de cada vez) em solução tampão e incubadas em anticorpos específicos (anti-superóxido dismutase (SOD) e anti-catalase (CAT), anti-ATGL-lipase triglicerides adiposo (ATGL), anti-CGI-58, a identificação do gene comparativo 58 (CGI-58), anti-FAS – anticorpos de ácidos graxos sintase sob constante agitação durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as membranas foram lavadas novamente três vezes (10 min de cada vez) em solução tampão e incubadas em anticorpo secundário conjugado com peróxido por 2h em temperatura ambiente. O excesso de anticorpo secundário foi lavado com tampão de lavagem e, em seguida, as membranas foram incubadas em substrato enzimático por 2 min e expostos em filme de raio X (Kodak XAR, Rochester, NY) com

intensificador (Cronex relâmpago Plus, DuPont, Wilmington, dE) em um casete de radiografia. A intensidade da banda foi determinada por radiografias de leitura desenvolvido pela densitometria óptica usando um scanner (HP 3400) e da Scion software de imagem (Scion Corporation).

**Atividades de enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD):** foi determinada de acordo com o método de McCord e Fridovich (BANNISTER & CALABRESE 1987). A estimativa da atividade enzimática ocorre por inibição auto-oxidação da adrenalina lido a 480nm em espectrofotômetro. Atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína. Para determinar a atividade da catalase (CAT), a amostra foi colocada em tampão fosfato 50 mM e a suspensão resultante foi centrifugada a 3.000g por dez minutos. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem de enzimas. Atividade da CAT foi medida utilizando a taxa de redução na absorbância peróxido de hidrogênio a 240nm, determinado de acordo com o método de Aebi (1984). Atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína.

**Dano oxidativo:** espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi medido como um marcador de peroxidação lipídica por espectrofotometria a 532nm. Os resultados foram expressos em nmol de proteína TBARS/mg, (DRAPER & HADLEY, 1990) e a geração de grupos carbonila na reação com dinitrofenilhidrazina foi usada como marcador de oxidação de proteínas. Conteúdo de carbonil foi determinado por espectrofotometria a 370nm com um coeficiente de 22,000 molar-1 e expressa como nmol/mg de proteína (LEVINE et al., 1990).

**Análise de proteínas por imunoblotting:** Assim que a anestesia foi assegurada pela perda de pedal e reflexos corneanos, foi aberta a cavidade abdominal, exposta a veia cava exposta, e 0,2 mL de solução salina normal (-) (6 ratos por grupo) ou insulina (10 - 6 mol.L-1) (+) foram injetados (6 ratos por grupo). Após a injeção de insulina (apenas para análise de caminho de insulina), adiposo, fígado e fragmentos de tecido muscular foram retirados cirurgicamente. Os tecidos foram homogeneizados imediatamente em 1,0 mL de extração buffer (1% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH 7,4, contendo 100 pirofosfato de sódio mM, 100 fluoreto de sódio mM, 10 mM EDTA, 10 vanadato de sódio mm, 2 mm PMSF e 0,1 mg de aprotinina ml) a 4 ° C com um MR Polytron 2100 (Kinematica, Suíça). Os extratos foram centrifugados a

11.000 rpm e 4°C em uma centrífuga eppendorf 5804R (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) por 40min para remover o material insolúvel, e o sobrenadante do tecido foi utilizado para a quantificação de proteínas, de acordo com o método de Bradford (1976). As proteínas foram desnaturadas por fervura em tampão de amostra Laemmli contendo 100 DTT 18mM. Posteriormente, 0,2 mg de extratos proteicos obtidos a partir de cada amostra foram separados por SDS-PAGE gel (15%) e membranas transferidos para membranas de nitrocelulose. Anticorpos usados para immunoblotting foram anti-IR, anti-fosfo IR, anti-IRS1, anti-fosfo IRS1 e anti-Akt, anti-fosfo Akt<sub>ser. 473</sub>, anti-APPL1, adipoR1 e adipoR2 (Santa Cruz Biotecnologia, Santa Cruz, CA, EUA). A detecção de quimiluminescência realizada com peroxidase-conjugada anticorpos secundários (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As radiografias das membranas foram levados para a visualização de bandas de proteínas. Os resultados dos blots estão apresentados como comparações diretas da área das bandas aparente em radiografias e quantificados por densitometria utilizando o software Scion Image (Scion software Image, ScionCorp, Frederick, MD).

**Análise estatística:** Os dados foram expressos com média e desvio padrão e analisados utilizando análise de variancia de duas vias (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey no Statistical Package for Social Sciences (SPSS 16.0), com nível de significância definido como  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência da obesidade e do DM2 têm aumentado significativamente nos últimos anos, o que tem levado de acordo com Tanaka (2007) a uma epidemia mundial. A relação do exercício físico no controle e tratamento da obesidade e na sensibilidade à insulina tem sido bem descrito na literatura (GOODYEAR & KANH, 1998; CHURCH, 2010), mas ainda existem lacunas no entendimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares relacionados a essa relação, em particular no envolvimento das ERO.

Estudos têm demonstrado que as alterações no estado redox celular estão diretamente relacionada com a obesidade em humanos e animais (FURUKAWA et al., 2004; CARMIEL-HAGGAI et al., 2005; STEFANOVIĆ et al., 2008; NOEMAN et al., 2011) e que o exercício físico é um importante agente na regulação de mediadores bioquímicos e moleculares durante esse processo lipolítico (BUETTNER et al. 2007; GOMEZ-CABRERA et al. 2008) devido ao fato do o exercício físico favorecer à melhora da tolerância a glicose, ao perfil lipídico e à produção de enzimas antioxidantes (GOLLISCH et al., 2009).

Os resultados gerais do presente estudo, demonstram que animais expostos a uma sobrecarga alimentar hiperlipídica possuem elevados níveis de estresse oxidativo e que o treinamento físico além de reduzir os efeitos negativos gerados no estado redox, promove uma redução no conteúdo de proteínas pró-inflamatórias que por fim, resulta no aumento na fosforilação das moléculas envolvidas na transdução do sinal intracelular da insulina.

O controle do peso corporal e o conteúdo de lactato foram utilizados para monitorar as alterações na massa corporal e a intensidade do treinamento dos animais, respectivamente. Conforme observado na Tabela 1, os animais que realizaram o treinamento físico e expostos a dieta padrão mesmo não tendo diminuído significativamente o peso corporal, demonstram a manutenção dos valores basais. Contudo, o grupo exposto à dieta hiperlipídica (DHL) apresentou um aumento significativo de peso corporal em relação ao grupo controle, o que sugere a eficácia da dieta utilizada para aumentar o peso total.

Tabela.1: Peso corporal e controle de treinamento

Grupos	Peso corporal (mg) Média±EPM	Lactato Sanguíneo (mmol/L) Média ± EPM			
		Basal	1 <sup>th</sup> sessão	20 <sup>th</sup> sessão	Última sessão
<b>C</b>	40,43±1.08	2,13±0,19	-	-	-
<b>DHL</b>	55,29±2.00*		-	-	-
<b>C+Ex</b>	37,14±0.90		3,92±0,13*	4,27±0,25*	4,13±0,27*
<b>DHL+Ex</b>	46,88±1.83* <sup>\$</sup>		4,10±0,10*	4,60±0,20*	4,48±0,28*

Tabela 1: peso corporal e controle de treinamento (nível de lactado sanguíneo, mmol/L) de camundongos expostos a dieta hiperlipídica (DHL) e ao treinamento físico e grupo controle (C). Valores são apresentados em média ± erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* diferente do grupo controle (SD) e \$ diferente para controle e exercício (C+Ex).

Fonte: Do pesquisador

Na presença do exercício os animais expostos a DHL, de forma concomitante, mostraram uma redução no peso corporal quando comparado aos animais não treinados. Apesar de não ter medido a massa muscular ou marcadores de hipertrofia, é possível que a baixa redução do peso corporal dos animais esteja diretamente relacionada ao aumento da massa muscular induzido pelo exercício.

Conforme Korvanen et al., (1989) o aumento da massa muscular além de interferir no peso corporal total, altera o metabolismo energético, devido às diferenças nas capacidades oxidativa e glicolítica, favorecendo ao consumo de gordura para a produção de energia.

Os resultados mostram um aumento no conteúdo de lactato em todos os grupos após as sessões de treinamento (imediatamente após a primeira, a vigéssima e na última sessão de treino), independentemente da massa corporal total dos animais. No entanto, o aumento observado se manteve, ao longo do treinamento, em um nível relativamente baixo o que sugere que o protocolo de treinamento utilizado reflete um nível de esforço com impacto significativo sobre o metabolismo aeróbio na produção de energia (ROBERGS & COLS. 2004; FUJITA et al., 2006)



## 5.1 A CONTRIBUIÇÃO DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE OS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS EXPOSTOS A DIETA HIPERLIPÍDICA

Tem sido relatado que a obesidade pode induzir ao estresse oxidativo e isso está associado com a superprodução de adipocinas pró-inflamatórias (ESPOSITO et al., 2006). Em contraste, a gordura corporal é inversamente proporcional a defesa antioxidante (CHRYSOHOOU et al., 2007; HARTWICH et al., 2007). Os resultados do presente estudo estão de acordo com àqueles observados em outros estudos, os quais demonstram que o tecido adiposo de animais expostos a dieta com alto teor de gordura exibem elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e baixos níveis de enzimas antioxidantes (VICENT & TAYLOR, 2006).

No entanto, o envolvimento do exercício físico na regulação do processo lipolítico ou lipogênico ainda necessita de investigações mais apuradas, em particular, na relação com estresse oxidativo.

O aumento da obesidade associada a ERO é provavelmente devido à relação entre a obesidade e inflamação crônica, isso porque adipócitos e pré-adipócitos têm sido identificados como uma fonte de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 (OLLER et al., 2009; YAMASHITA et al., 2010) e estas citoquinas são importantes estimuladores para a produção de ERO por macrófagos e monócitos (MORROW, 2003). Além disso, observa-se alterações na via lipolítica acumulando triacilglicerol (TAG) no tecido adiposo, o que aumenta a obesidade.

A ATGL é uma enzima que catalisa a primeira etapa da lipólise e o identificador genético comparativo 58 (CGI-58) possui um papel crucial na degradação de triglicerídeos (YAMAGUCHI, 2009).

A interação de ambas proteínas aumenta a atividade hidrolítica de ATGL até 20 vezes (GRUBER et al., 2010) enquanto que A FAS tem um papel central na biossíntese de ácidos graxos. Em animais, a inibição ou mutações na CGI-58 e ATGL promovem a obesidade, portanto, mudanças na atividade e conteúdo dessas proteínas decorrem de alterações ou distúrbios metabólicos importantes (GRUBER et al., 2010).

Nossos dados mostraram que o nível de proteína FAS (Figura A) foi aumentada no tecido adiposo em animais expostos a dieta com alto teor de gordura, favorecendo a síntese de gordura, enquanto não houve mudanças significativas nos níveis de ATGL (Figura 1B) e CGI-58 (Figura 1C). Contudo, animais obesos expostos ao treinamento físico

apresentaram níveis mais elevados de ATGL mantendo os níveis de FAS e CGI-58 próximo aos valores basais.

Chapados et al. (2008) têm demonstrado que o exercício físico diminui a lipólise visceral em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os autores mostraram que a elevação da lipólise foi reduzida pelo treinamento, simplesmente por refletir uma redução na massa de gordura no tecido adiposo. Em conjunto, esses achados sugerem uma interrupção da lipólise induzida pelo exercício nos animais obesos e isso pode estar acompanhado de um sistema antioxidante mais eficiente. A intensidade e duração do exercício físico contribuem para determinar a lipólise, atividades moderadas são as mais indicadas, devido o aumento de catecolaminas pela utilização do triglicerídeo intramuscular, que favorece o aumento da oxidação de gorduras.

As enzimas antioxidantes intracelulares desenvolvem um importante papel nas defesas contra as ERO. A SOD e CAT são as duas principais enzimas que removem radicais livres in vivo e a diminuição na atividade destas enzimas que podem levar a um excesso de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, que por sua vez pode gerar radicais hidroxilas e atacam estruturas celulares (HALLIWELL & GUTERIDGE, 2007).

Figura 1 A

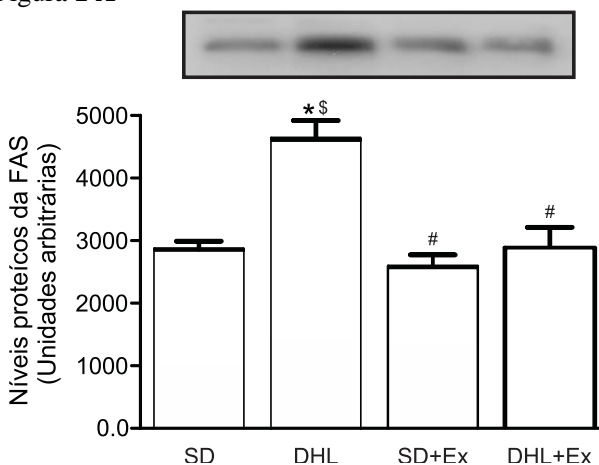


Figura 1 B

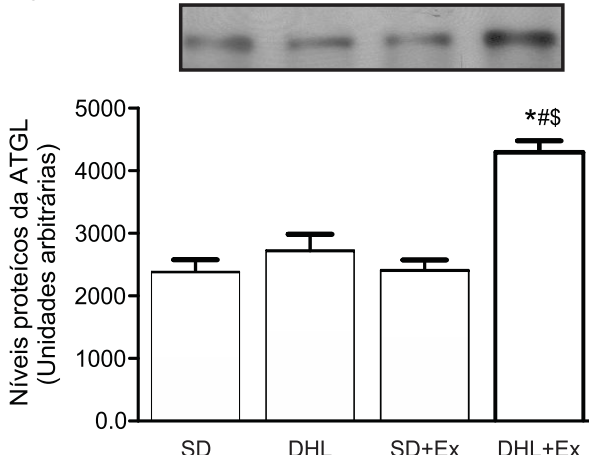


Figura 1C

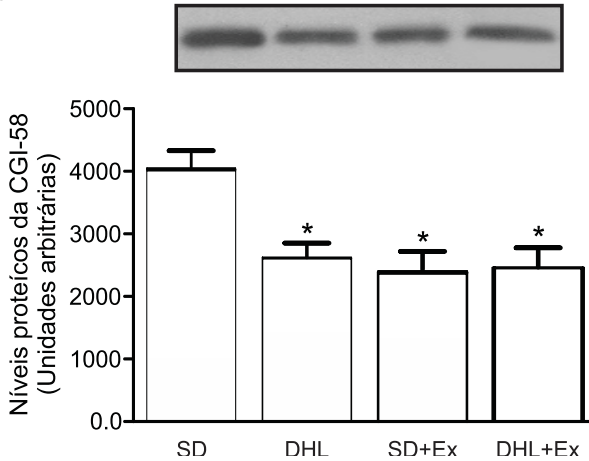


Figura 1: níveis de FAS (1A), ATGL (1B) e CGI-58 (1C) e no epidídimo de camundongos submetidos ao treinamento e expostos a dieta hiperlipídica. Valores são apresentados em média  $\pm$  erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* diferente do grupo controle (SD), # diferente da dieta hiperlipídica (DHL) e \$ diferente do controle + exercício (SD+Ex).

Fonte: Do pesquisador

O aumento da atividade e no conteúdo de SOD (Figura 2A e 2B) observado no presente estudo provavelmente resulta do aumento concomitante na produção de ERO (superóxido) e isto não significa necessariamente que a célula está exposta ao estresse oxidativo, visto que a medida em que os benefícios do exercício moderado (treinamento) pode estar relacionado a regulação do SOD (atividade e conteúdo).

O aumento da atividade e nível de enzimas antioxidantes induzida por exercício é a principal razão para a redução de danos oxidativos, também observado no presente estudo. A redução de CAT (Figuras 2C e 2D) pode ser devido ao consumo rápido e exaustão de armazenamento desta enzima no combate radicais livres gerados durante o desenvolvimento da obesidade (NOEMAN et al., 2011), embora o aumento da atividade fosse um resultado esperado.

A diminuição da catalase pode conduzir a um desequilíbrio redox e pode promover o acúmulo de peróxido hidrogênio e reagir com os metais de transição, gerando o radical hidroxila, que é o radical mais deletério à biomoléculas. Isto pode explicar o aumento observado no dano oxidativo após a dieta hiperlipídica. Verifica-se ainda uma modulação diferente da SOD e CAT em animais treinados, quando comparado aos não treinados. O resultado mais significativo foi o aumento considerável da atividade de SOD e níveis de proteína observados em animais treinados sem um aumento proporcional na atividade da CAT. A SOD reduz radical superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é o substrato para CAT. Quando a célula aumenta os níveis de SOD sem um aumento proporcional nas peroxidases, as células enfrentam um desafio de sobrecarga de peróxido de hidrogênio (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007).

Figura 2 A

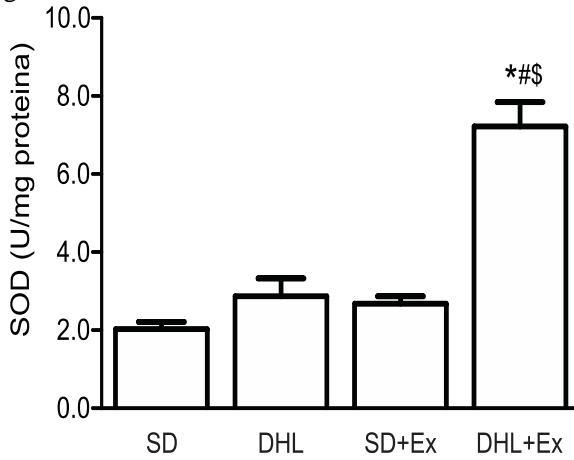


Figura 2 B

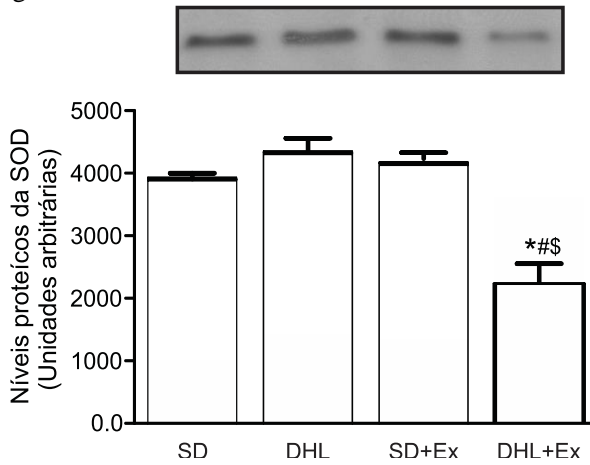


Figura 2 C

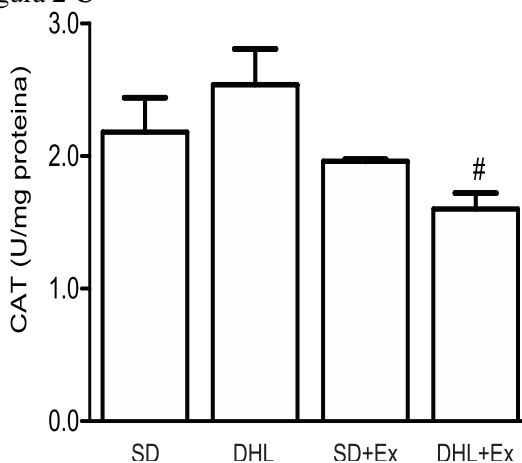


Figura 2 D

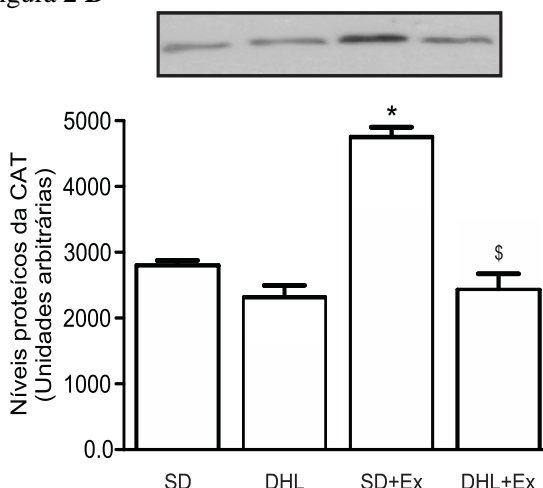


Figura 2: atividade e nível da superóxido dismutase no epidídimo (2A e 2B), atividade e nível de catalase no epidídimo (2C e 2D), de camundongos submetidos ao treinamento e expostos a dieta hiperlipídica. Valores são apresentados em média  $\pm$  erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* diferente do grupo controle (SD), # diferente da dieta hiperlipídica (DHL) e \$ diferente do controle e exercício (SD+Ex).

Fonte: Do pesquisador

Como a redução da catalase não foi alterada diretamente pelo exercício, é possível que a diminuição do dano oxidativo seja devido à redução da resposta inflamatória induzida pela DHL, como sugerido por Noeman et al. (2011).

De acordo com Petersen e Pedersen (2005), o exercício físico exerce um efeito anti-inflamatório, induzindo aumento dos níveis de IL-6, que induz efeitos anti-inflamatórios, por estimular a produção de IL-1ra e IL-10, e também inibir a produção de TNF- $\alpha$  (LANCASTER, 2006, PINHO et al., 2010., JENKINS et al., 2009). Além disso, o treinamento físico parece atenuar a atividade NADPH oxidase como resultado da produção elevada de eNOS e outros fatores (JENKINS et al., 2009).

Em um estudo de Sakuray e colegas (2009) que verificaram os efeitos do treinamento físico sobre o estresse oxidativo em tecido adiposo de camundongo, demonstraram uma incidência sobre a inflamação e adipocinas relacionadas. Os resultados mostraram uma redução no dano oxidativo e aumento do teor de SOD induzida pelo treinamento físico, sem aumento concomitante de peroxidases. Além disso, o estudo também mostrou uma diminuição na expressão de NADPH-oxidase, e os autores sugerem que esta redução está associada com menor dano oxidativo em animais exercitados.

Os níveis elevados de TBARS (Figura 3A) e carbonil (Figura 3B) em animais expostos a dieta hiperlipídica estão possivelmente associados com os níveis de oxidantes aumentados e com os níveis diminuídos ou insuficientes de enzimas antioxidantes como SOD e catalase. Nossos resultados mostram que a gordura corporal é um fator de risco para aumentar o dano oxidativo e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes, em concordância com outros estudos.

Noeman et al. (2011) encontraram resultados semelhantes e sugerem que um aumento de danos oxidativos ocorre devido a lesão celular progressiva e cumulativo resultante da pressão da grande massa corporal.

Figura 3 A

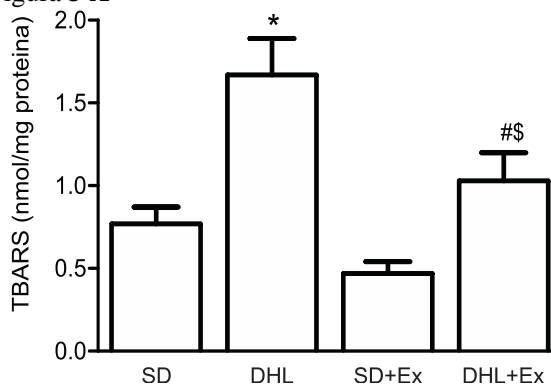


Figura 3 B

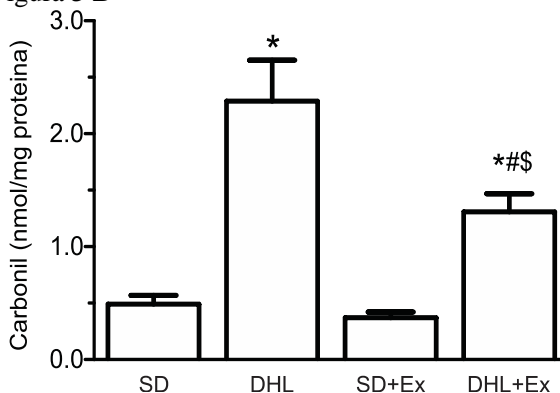


Figura 3: Nível de TBARS (3A) e conteúdo de carbonil (3B) de epidídimo de camundongos submetidos ao treinamento e expostos a dieta hiperlipídica. Valores são apresentados em média  $\pm$  erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* diferente do grupo controle (SD), # diferente da dieta hiperlipídica (DHL) e \$ diferente para controle e exercício (SD+Ex).

Fonte: Do pesquisador

Em conclusão, como o treinamento físico promoveu uma recuperação nos níveis de ATGL, reduziu o ganho de peso corporal e aumentou o sistema de defesa antioxidante com redução dos danos oxidativos, podemos inferir que o efeito protetor do treinamento possui uma ligação entre as vias lipolíticas e as vias de produção de ERO. No entanto, uma vez que não determinou citocinas anti-inflamatórias e



NAPH-oxidase, o papel exato do treinamento físico na modulação do estresse oxidativo em animais expostos a dieta devem ser confirmados em estudos futuros.

## 5.2 A CONTRIBUIÇÃO DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA EM DIFERENTES TECIDOS DE ANIMAIS EXPOSTOS A DIETA HIPERLIPÍDICA

O exercício físico tem sido descrito como uma forma de controlar a homeostase da glicose e aumentar a sensibilidade da insulina em alguns tecidos (PAULI et al., 2009). O mecanismo molecular envolvido na sensibilidade à insulina mediada pelo exercício físico pode estar relacionado ao aumento no nível ou ativação de proteínas que modulam o metabolismo (WHITE & KAHN, 1994; HOUMARD et al., 1999; ROPELLE et al., 2006).

IR, IRS e Akt, são moléculas envolvidas na captação de glicose (HOUMARD et al., 1999) e vários estudos têm demonstrado que o exercício físico é suficiente para promover a reversão da resistência à insulina em camundongos diabéticos e obesos (BORGHOUTS et al., 2000; BOULÉ et al., 2001; HENRIKSEN, 2002; BAJPEYI et al., 2009; LIAO & XU, 2011).

Avaliando a via de sinalização de insulina pelos receptores IR, IRS1 e Akt em tecido adiposo, fígado e músculo, observamos que a dieta hiperlipídica aumentou a resistência em todos os tecidos, por diminuir a fosforilação do IR, IRS1 e por fosforilar a Akt em serina diminuindo a transdução do sinal. Outros estudos tiveram resultados semelhantes avaliando a via de sinalização celular após duas horas de exercício, onde consumo de glicose foi elevado provavelmente pelo aumento da contração muscular (BORGHOUTS & KEIZER, 2000).

Uma simples sessão de exercício de forma aguda, de acordo com O'Gorman et al., (2006) pode aumentar a sensibilidade à insulina por até 16 horas após o exercício por modificar o conteúdo do GLUT4 em tecido insulino-dependentes. O exercício tem sido ligado também a homeostase energética e a mudança na sensibilidade da insulina após uma única sessão de exercício em tecidos como músculo, fígado e hipotálamo (ROPELLE et al., 2006; PAULI et al., 2008).

No presente trabalho, o treinamento físico não apresentou efeito totalmente protetor a resistência à insulina em animais expostos à dieta hiperlipídica comparado ao grupo controle, no entanto, quando comparados os dois grupos obesos, o treinamento físico apresentou melhora significativa na fosforilação do IR, IRS1 e Akt, em todos os

tecidos: adiposo (Figuras 4 A-C), músculo (Figuras 5 A-C) e fígado (Figuras 6 A-C).

Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos utilizando animais obesos (HEVENER et al., 2000; SAENGSIRISUWAN et al., 2004; BAJPEYI et al., 2009), o quais demonstraram que treinamento físico foi eficaz na melhora à sensibilidade à insulina, aumentando a fosforilação do IRS-1/2, bem como a associação dessas proteínas com a PI3K em animais estimulados com insulina quando comparados aos animais controles.

Figura 4 A

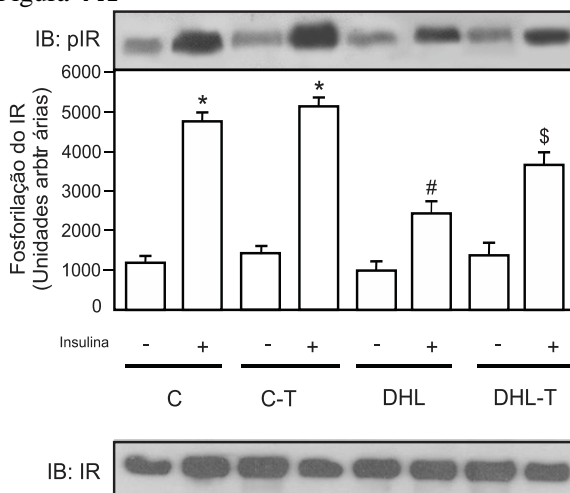


Figura 4 B

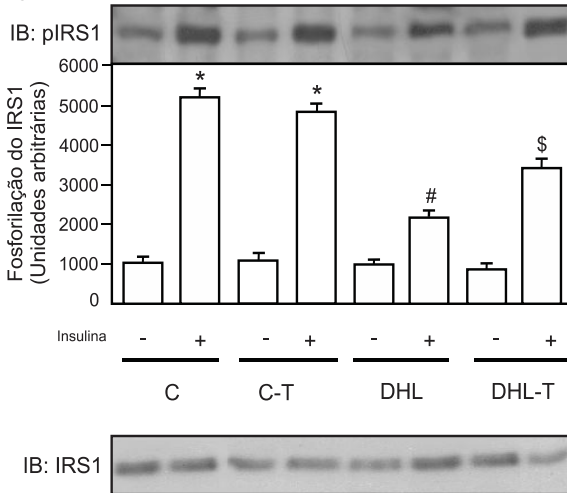


Figura 4 C

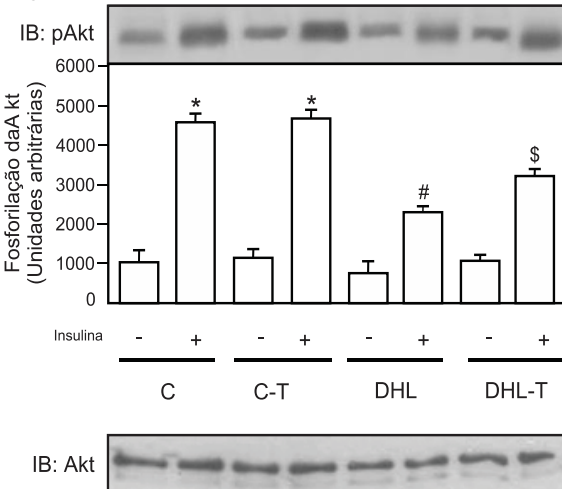


Figura 4: efeitos do treinamento no nível de proteína do receptor de insulina – IR (4A), substrato do receptor de insulina 1 – IRS (4B), proteína quinase – AKT (4C) em tecido adiposo de camundongos expostos a dieta hiperlipídica. Valores são apresentados em média  $\pm$  erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* comparado ao grupo controle (C), # dieta hiperlipídica (DHL) comparado a todos os grupos e \$ controle e exercício (C+T) comparados a todos os grupos. Fonte: Do pesquisador

Figura 5 A

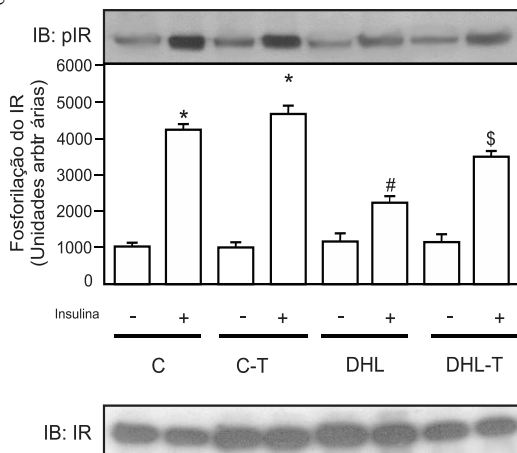


Figura 5 B

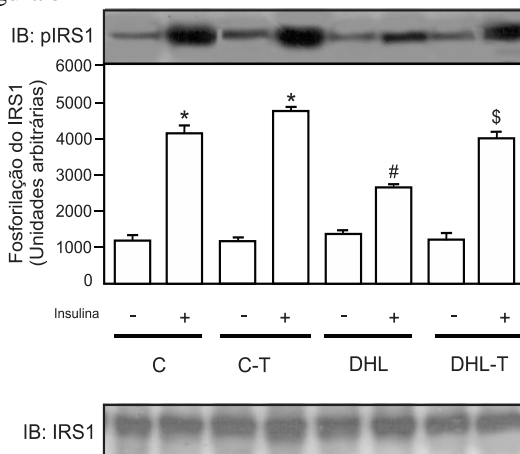


Figura 5 C

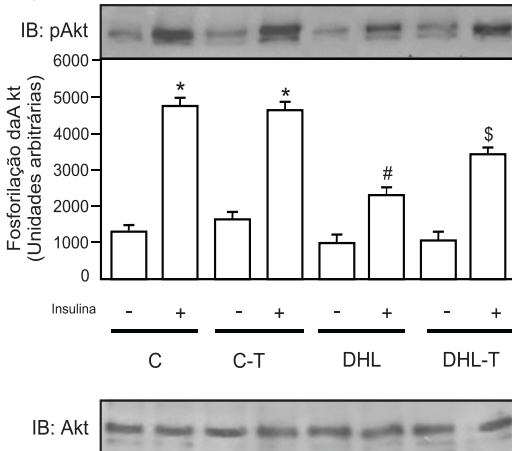


Figura 5: efeitos do treinamento no nível de proteína do receptor de insulina – IR (5A), substrato do receptor de insulina 1 – IRS (5B), proteína quinase – AKT (5C), no fígado de camundongos expostos a dieta hiperlipídica. Valores são apresentados em média  $\pm$  erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* comparado ao grupo controle (C), # dieta hiperlipídica (DHL) comparado a todos os grupos e \$ controle e exercício (C+T) comparados a todos os grupos.

Fonte: Do pesquisador

Figura 6 A

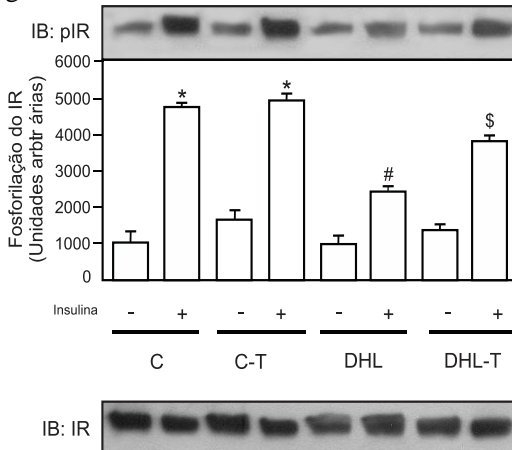


Figura 6 B

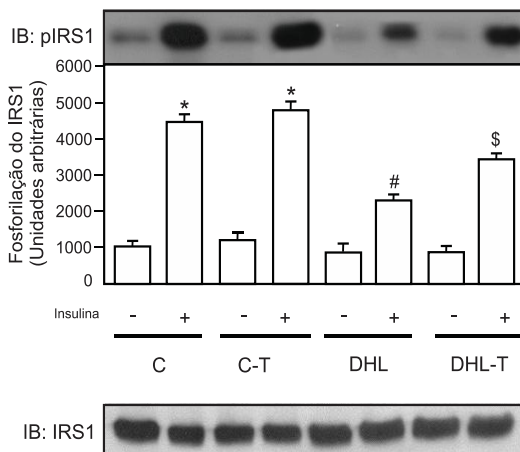


Figura 6 C

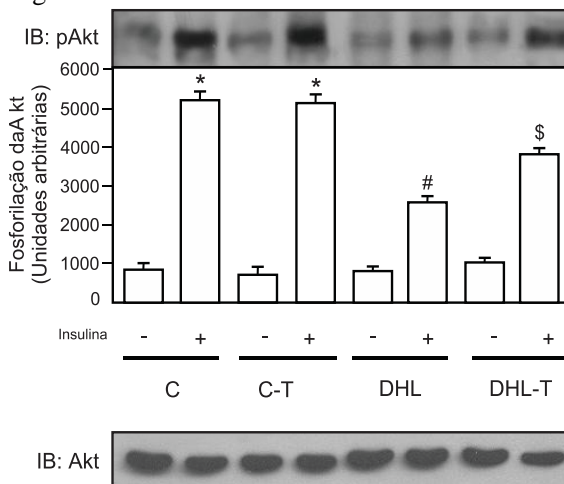


Figura 6: efeitos do treinamento no nível de proteína do receptor de insulina – IR (6A), substrato do receptor de insulina 1 – IRS (6B), proteína quinase – AKT (6C) no tecido muscular de camundongos expostos a dieta hiperlipídica. Valores são apresentados em média  $\pm$  erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* comparado ao grupo controle (C), # dieta hiperlipídica (DHL) comparado a todos os grupos e \$ controle e exercício (C+T) comparados a todos os grupos.

Fonte: Do pesquisador

Importante ressaltar que a idade é um fator importante na via de sinalização da insulina. Tem sido demonstrado que a idade pode diminuir o nível de proteínas IR nos músculos dos ratos idosos em aproximadamente 35%, embora esta diminuição é revertida após uma única sessão de exercício aguda (PAULI et al., 2009).

Outro estudo chegou à conclusão semelhante, e mostra que este fenómeno é acompanhado por um aumento concomitante da sensibilidade à insulina no fígado, resultando em uma menor taxa de produção de glicose hepática (ATTIE & SHERER, 2009). Em humanos, o exercício físico aumenta a expressão de IRS1 e IRS2, após exercícios de resistência aeróbia (JORGE et al., 2011).

A sensibilidade à insulina pode ser melhorada por elevar os níveis de adiponectina. Adiponectina é adipocina predominantemente secretada por adipócitos diferenciados e estão envolvidos na homeostase de energia, a sensibilidade à insulina, e na resposta anti-inflamatória (LIRA et al., 2012). No entanto, a adipocina é reduzida em indivíduos obesos. Adiponectina exerce sua ação através de seus receptores AdipoR1 e ADIPOR2. AdipoR1 e ADIPOR2 interage com a proteína adaptadora contendo domínio de homologia com pleckstrin, domínio de ligação com fosfotirosina e motivo de zipper de leucina, proteína endossomal adaptadora 1 (APPL1), e sua interação para ter um papel importante na ativação da AMPK pela adiponectina (SHEHZAD et al., 2012).

Tem sido demonstrado que a proteína adaptadora endossomal, APPL1, regula a actividade de Akt (SHENCK et al., 2008). No presente estudo, mostramos que animais obesos induzida por dieta hiperlipídica concomitantemente exercitados apresentam melhora na sinalização de insulina em diferentes tecidos: adiposo (Figuras 7 A-B), músculo (Figuras 8 A-B) e fígado (Figuras 9 A-B). Essa resposta, pode ser atribuída, pelo menos em parte, aos níveis de recuperação receptores de adiponectina e APPL1.

Figura 7 A

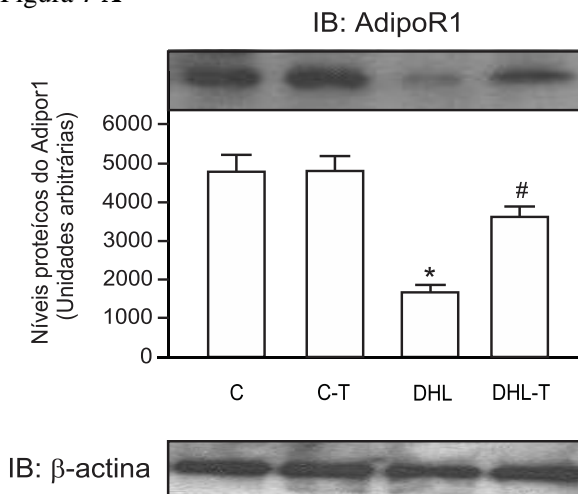


Figura 7 B

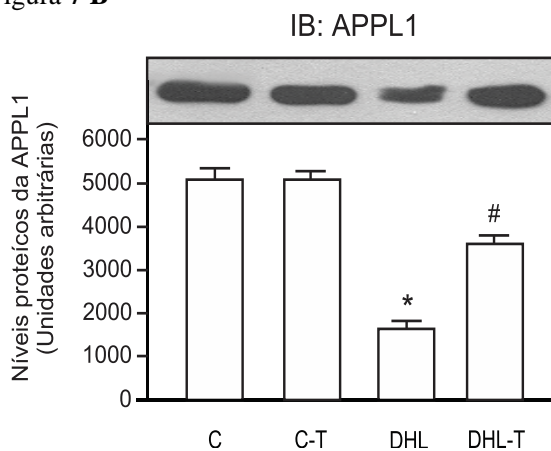


Figura 7: efeitos do treinamento no nível de AdipoR1 (7A) e APPL1 (7B) em tecido adiposo de camundongos expostos a dieta hiperlipídica. Valores são apresentados em média  $\pm$  erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* diferente do grupo controle (C), # diferente da dieta hiperlipídica (DHL).

Fonte: Do pesquisador



Figura 8 A

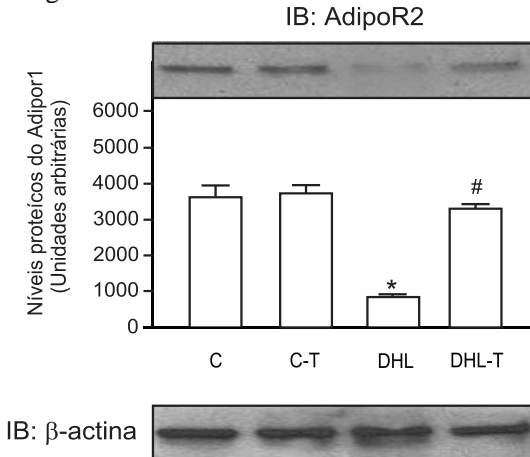


Figura 8 B

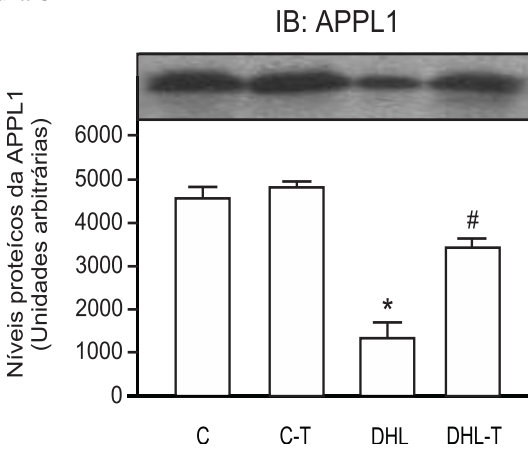


Figura 8: efeitos do treinamento no nível AdipoR2 (8A) e APPL1 (8B) no fígado de camundongos expostos a dieta hiperlipídica. Valores são apresentados em média  $\pm$  erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* diferente do grupo controle (C), # diferente da dieta hiperlipídica (DHL).

Fonte: Do pesquisador

Figura 9 A

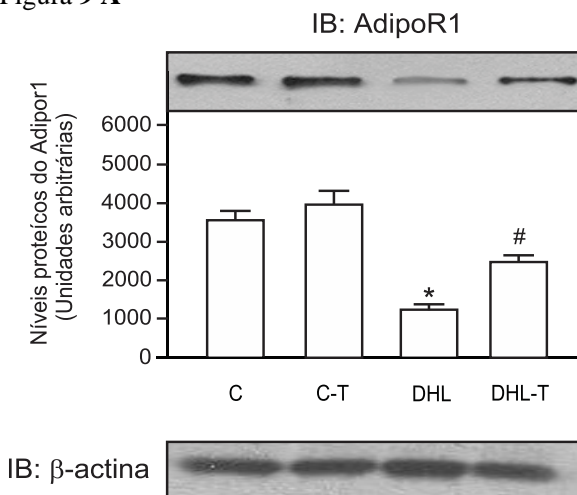


Figura 9 B

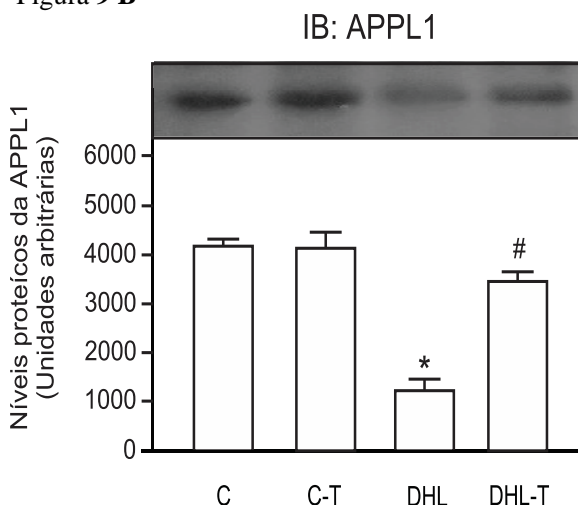


Figura 9: efeitos do treinamento no nível AdipoR1 (9A) e APPL1 (9B) no tecido muscular de camundongos expostos a dieta hiperlipídica. Valores são apresentados em média  $\pm$  erro médio padrão e valor de  $p < 0.05$  foi considerado como nível de significância entre os grupos. \* diferente do grupo controle (C), # diferente da dieta hiperlipídica (DHL).

Fonte: Do pesquisador

Estudos anteriores demonstraram que o exercício físico induz um aumento dos níveis de adiponectina (LIRA et al., 2011), e níveis de AdipoR1 em músculo esquelético (MARINHO et al., 2012) sugerem que o exercício aumenta ação da insulina através do aumento adicional de APPL1 no fígado de ratos obesos.

Tomados em conjunto, nossos dados demonstraram que a resistência à insulina relacionada a dieta hiperlipídica é regulada por adipoR1-2/APPL1 e quando expostos concomitantemente ao treinamento físico os animais obesos apresetam um maior conteúdo de adipoR1-2/APPL1 o que leva a uma menor resistência a insulina.

## CONCLUSÃO

- a) O exercício físico melhorou os níveis proteicos de FAS, ATGL e CGI-58;
- b) O exercício físico contribuiu para a diminuição do dano oxidativo em gordura visceral de animais expostos a DHL;
- c) O exercício físico aumentou a produção de enzimas antioxidantes em gordura visceral de animais expostos a DHL;
- d) O exercício físico apresentou um efeito protetor no processo lipolítico em gordura visceral de animais expostos a DHL;
- e) O exercício físico contribuiu para a melhor da atividade e expressão da via de sinalização IR, IRS 1, Akt, AdipoR1-2 e APPL1 no tecido adiposo;
- f) O exercício físico contribuiu para a melhor da atividade e expressão da via de sinalização IR, IRS 1, Akt, AdipoR1-2 e APPL1 no músculo esquelético;
- g) O exercício físico contribuiu para a melhor da atividade e expressão da via de sinalização IR, IRS 1, Akt, AdipoR1-2 e APPL1 no fígado.

## PERPECTIVAS

O estudo apresenta algumas limitações as quais sugerem que novos estudos sejam conduzidos para melhor elucidar os mecanismos moleculares e bioquímicos que o exercício físico proporciona em animais obesos. Algumas questões podem ser alvo de futuras investigações na relação entre as variáveis moleculares e bioquímicas, como por exemplo avaliar a relação entre as duas vias relacionados a obesidade de maneira que as análises sejam conjuntas, verificando quem se sobrepõe, tanto no estabelecimento da obesidade por meio da DHL com a ação do treinamento físico.

No mesmo sentido, seria importante também verificar a relação das moléculas lipolíticas e lipogênicas com marcadores de estresse oxidativo e de sinalização molecular em tecidos centrais e periféricos em animais expostos a diferentes modelos de treinamento como: natação, corrida, exercício resistido entre outros, com volumes e intensidades variadas como: 40%, 60%, 80% do  $VO_2$  máx., da mesma forma com método de treinamento contínuo ou intervalado.

## REFERENCIAS

AEBI H. **Catalase in vitro**. Methods Enzymol. 1984;105:121-126.

ALESSIO HM, GOLDFARB AH. **Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise**: adaptive response to training. J Appl Physiol. 1988 Apr;64(4):1333-6.

ANTONIADES C, TOUSOULIS D, TENTOLOURIS C, TOUTOUZAS P, STEFANADIS C. **Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis**. From basic research to clinical practice. Herz. 2003 Nov;28(7):628-38.

ATTIE AD, SCHERER PE. **Adipocyte metabolism and obesity**. J Lipid Res. 2009; 50.S395-9.

BACKER JM, MYERS MGJR, SHOELSON SE, CHIN DJ, SUN XJ, MIRALPEIX M, HU, P; MARGOLIS, B; SKOLNIK, E.Y; SCHLESSINGER, J. **Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation**. EMBO J. 1992.11(9):3469-79.

BAJPEYI S. et al. **Effect of exercise intensity and volume on persistence of insulin sensitivity during training cessation**. J Appl Physiol 2009.106:1079–85.

BANNISTER JV, CALABRESE L. **Assays for SOD**. Meth. Biochem. Anal. 1987. v.32, p. 279-312,

BASTARD JP, MAACHI M, TRAN VNJ, JARDEL C, BRUCKERT E, GRIMALDIA, ROBERT JJ, CAPEAU J, HAINQUE B. **Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro**. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2002. 2084-87.

BJORBAEK C, UOTANI S, DA SILVA B, FLIE JS. **Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor.** *J Biol Chem.* 1997.19;272(51):32686-95.

BLAKEMORE AIF, FROGUEL P. **Is Obesity Our Genetic Legacy?** *J. Clin Endocrinol Metab.* 2008. 93(11):S51–56.

BOULÉ NG, HADDAD E, KENNY GP, WELLS GA, SIGAL RJ. **Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials.** *JAMA.* 2001. 12;286(10):1218-27.

BORGHOUTS LB, KEIZER HA. **Exercise and insulin sensitivity: a review.** *Int J Sports Med* 21.2000. 1–12.

BRADFORD MM. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 72. 1976. 248–254.

BROCHU-GAUDREAU K, REHFELDT C, BLOUIN R, BORDIGNON V, MURPHY BD, PALIN MF. **Adiponectin action from head to toe.** *Endocrine.* 2010 Feb;37(1):11-32.

BRUNET A, BONNI A, ZIGMOND MJ, LIN MZ, JUO P, HU LS, ANDERSON MJ, ARDEN KC, BLENIS J, GREENBERG ME. **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** *Cell.* 1999. 6: 857-68,

BUETTNER R, SCHÖLMERICH J, BOLLHEIMER CL. **High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents.** *Obesity.* 2007.15:798–808.

CARMIEL-HAGGAI M, CEDERBAUM AI, NIETO N.A. **high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats** h. Faseb J. 2005. 19:136-138.

CARVALHO-FILHO MA. et al. **S-Nitrosation of the Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate 1, and Protein Kinase B/Akt: A Novel Mechanism of Insulin Resistance.** Diabetes.2005 april. vol. 54,

CAZZOLA R. et al. **Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls.** Eur. J. Clin. Invest. 2003.33: 924-30.

CHAPADOS N, COLLIN P, IMBEAULT P, CORRIVEAU P, LAVOIE JM. **Exercise training decreases in vitro stimulated lipolysis in a visceral (mesenteric) but not in the retroperitoneal fat depot of high-fat-fed rats.** Br J Nutr. 2008 Sep;100(3):518-25

CHENG KK, IGLESIAS MA, LAM KSL, WANG Y, SWEENEY G, ZHU W, VANHOUTTE PM, KRAEGEN EW, XU A. **APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes via Akt activation in mice.** Cell Metab. 2009a. 9: 417-427.

CHOW L, FROM A, SEAQUIST E. **Skeletal muscle insulin resistance: the interplay of local lipid excess and mitochondrial dysfunction.** Metabolism Clinical and Experimental. 2010. 59. 70-85.

CHILDS A, JACOBS C, KAMINSKI T, HALLIWELL B, LEEUWENBURGH C. **Supplementation with vitamin C and N-acetylcysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise.** Free Radic Biol Med. 2001. n.31 p.745-753.



CHURCH TIM. **Exercise in Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes.** Progress in Cardiovascular Disease. 2011. 53:412 – 418.

CHRYSOHOOU C, PANAGIOTAKOS DB, PITSAVOS C, SKOUMAS J, ECONOMOU M, PAPADIMITRIOU L, STEFANADIS C. **The association between pre-hypertension status and oxidative stress markers related to atherosclerotic disease: the ATTICA study.** Atherosclerosis. 2007 May;192(1):169-76.

CINTRA DE, ROPELLE ER, PAULI JR. **Obesidade e Diabetes: fisiopatologia e sinalização celular.** 2011. São Paulo: Sarvier.

CINTRA DE, ROPELLE ER, PAULI JR. **Brain regulation of food intake and expenditure energy: molecular action of insulin, leptin and physical exercise.** Rev Neurol. 2007.1-15;45(11):672-82.

COOPER CE, VOLLAARD NB, CHOUERI T, WILSON MT. **Exercise, free radicals and oxidative stress.** Biochem Soc Trans. 2002. 30:280-5.

DE SOUZA CT, ARAUJO EP, BORDIN S, ASHIMINE R, ZOLLNER RL, BOSCHERO AC, SAAD MJ, VELLOSO LA. **Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus.** Endocrinology. 2005. 146(10):4192-9.

DRAPER HH, HADLEY M. **Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation.** Meth. Enzymol. 1990. n.186. p.421-431.

ESPIRITU DJ, MAZZONE T. **Oxidative Estresse Regulates Adipocyte Apolipoprotein E and Suppresses Its Expression in Obesity.** Diabetes. 2008. 57 (11):2992-8.

ESPOSITO K, GIUGLIANO G, SCUDERI N, GIUGLIANO D. **Role of adipokines in the obesity-inflammation relationship**: the effect of fat removal. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Sep 15;118(4):1048-57; discussion 1058-9. Review.

EL-HASCHIMI K, PIERROZ DD, HILEMAN SM, BJORBAEK C, FLIER JS. **Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity**. *J Clin Invest*. 2000. 105:1827–1832.

FARIAS JÚNIOR JC, SILVA KS. Sobrepeso/ Obesidade em Adolescentes Escolares da Cidade de João Pessoa- PB: Prevalência e Associação com Fatores Demográficos e Socioeconômicos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. 2008. v.14, n. 2, Mar./abr.

FISBERG M. **Atualização em obesidade na infância e adolescência**. São Paulo: editora Atheneu, 2005.

FOSTER-SCHUBERT KE, CUMMINGS DE. **Emerging Therapeutic Strategies for Obesity**. *Endocrine Reviews*. 2006. 27(7):779–793.

FRANSSSEN R, MONAJEMI R, STROES E, KASTELEIN J. **Obesity and Dyslipidemia**. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*. 2008. 37 (3):623-633.

FRANKE TF, KAPLAN DR, CANTLEY LC. **PI3K**: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997. Feb 21;88(4):435-7.

FRIEDMAN JM, HALAAS JL. **Leptin and the regulation of body weight in mammals**. *Nature*. 1998. 395:763–770.

FUJITA K, NISHIZAWA H, FUNAHASHI T, ET AL. **Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome**. *Circ J*. 2006. 70:1437–1442.

FURUKAWA S, FUJITA T, SHIMABUKURO M, IWAKI M, YAMADA Y, NAKAJIMA Y, NAKAYAMA O, MAKISHIMA M,

MATSUDA M, SHIMOMURA I. **Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.** J Clin Invest. 2004. 114:1752-1761.

GARCIA LMT, FREIRE CC, PEREIRA DZ, OLIVEIRA JL, VITALLE MSS. Do diagnóstico à ação: Programa de Atividades para o Paciente obeso (PAPO) - uma abordagem interdisciplinar com adolescentes. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde.** 2010. v. 15, n.3.

GIL-CAMPOS M, CAÑETE RR, GIL A. **Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity.** Clin Nutr. 2004. 23(5):963-74.

GOLLISCH KS, BRANDAUER J, JESSEN N, TOYODA T, NAYER A, HIRSHMAN MF, GOODYEAR LJ. **Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats.** Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009. Aug;297(2):E495-04.

GOMEZ-CABRERA MC, DOMENECH E, VINA J. **Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training.** Free Radic Biol Med. 2008. 44:126–131.

GOODYEAR LJ, KAHN BB. **Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity.** Annu Rev Med. 1998. 49:235-61.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **The chemistry of free radicals and related “reactive species”.** Free Radicals in biology and medicine. 2007. 4 ed. New York: Oxford.

HARTWICH J, GÓRALSKA J, SIEDLECKA D, GRUCA A, TRZOS M, DEMBINSKA-KIEC A. **Effect of supplementation with vitamin E and C on plasma hsCRP level and cobalt-albumin binding score as**

**markers of plasma oxidative stress in obesity.** Genes Nutr. 2007 Oct;2(1):151-4

HENRIKSEN EJ. **Invited review:** Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. J Appl Physiol. 2002. 93(2):788-96.

HEVENER AL, REICHART D, OLEFSKY J. **Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat.** Diabetes. 2000 Dec;49(12):2154-9.

HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, SPIEGELMAN BM. **Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha:** direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 1993.1:87-91.

HOTTA K, FUNAHASHI T, ARITA Y, TAKAHASHI M, MATSUDA M, OKAMOTO Y, IWAHASHI H, KURIYAMA H, OUCHI N, MAEDA K, NISHIDA M, KIHARA S, SAKAI N, NAKAJIMA T, HASEGAWA K, MURAGUCHI M, OHMOTO Y, NAKAMURA T, YAMASHITA S, HANAFUSA T, MATSUZAWA Y. **Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000. Jun;20(6):1595-9.

HOUWARD JA, SHAW CD, HICKEY MS, TANNER CJ. **Effect of short-term exercise training on insulin-stimulated PI 3-kinase activity in human skeletal muscle.** Am J Physiol 1999. 277, E1055-1060.

HUANG H, IIDA KT, SONE H, YOKOO T, YAMADA N, AJISAKA R. **The effect of exercise training on adiponectin receptor expression in KK<sup>Ay</sup> obese/diabetic mice.** J Endocrinol. 2006. Jun;189(3):643-53.

HULVER MW, ZHENG D, TANNER CJ, HOUWARD JA, KRAUS WE, SLENTZ CA, SINHA MK, PORIES WJ, MACDONALD KG &

DOHM GL. **Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action.** American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism. 2002. 283 E861–E865.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF. IBGE. 2010.

JELLEMA A, PLAT J, MENSINK RP. **Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state.** European Journal of Clinical Investigation. 2004. 34: 766-73.

JENKINS NT, WITKOWSKI S, SPANGENBURG EE, et al. **Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide in putative endothelial progenitor cells: role of NAPDH oxidase.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009. 297:H1798-1805.

JORGE MLMP, et al. **The effects of aerobic, resistance, and combined exercise on metabolic control, inflammatory markers, adipocytokines, and muscle insulin signaling in patients with type 2 diabetes mellitus.** Metabolism Clinical and Experimental. 2011. 60.1244-1252.

KARALIS KP, GIANNOGONAS P, KODELA E, KOUTMANI Y, ZOUMAKIS M, TELI T. **Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress.** Federation of European Biochemical Societies Journal 2009. 276: 5747-54.

KASUGA M, HEDO JA, YAMADA KM, KAHN CR. **The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor.** J Biol Chem. 1982. Sep 10;257(17):10392-9.

KOVANEN V. **Effects of ageing and physical training on rat skeletal muscle.** An experimental study on the properties of collagen, laminin, and fibre types in muscles serving different functions. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1989. 577:1-56.

KRAEMER RR, CHU H, CASTRACANE DV. **Leptin and Exercise.** *Exp Biol Med.* 2002. (Maywood). 227 (9):701-8.

KRAWCZYK SA, HALLER JF, FERRANTE T, ZOELLER RA, CORKEY BE. **Reactive Oxygen Species Facilitate Translocation of Hormone Sensitive Lipase to the Lipid Droplet During Lipolysis in Human Differentiated Adipocytes.** *PLoS ONE* 7 (4): e 34904. doi: 10.1371.

LANCASTER GI. Exercise and cytokines. In: **Immune Function in Sport and Exercise.** Neil, C, Gleeson, M, MacLaren, D (eds). New York: Elsevier. 2006.

LARA-CASTRO C, FU Y, CHUNG BH, GARVEY WT. **Adiponectin and the metabolic syndrome:** mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2007. 18(3):263-70.

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, AMICI A, CLIMENT I, LENZ AG, AHN BW, STADTMAN ER. **Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins.** *Meth. Enzymol.* 1990. n.186. p.464-478.

LENZ M, RICHTER T, MÜHLHAUSER I. **The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood:** a systematic review. *Deutsches Aerzteblatt international.* 2009. 106: 641-8.

LIAO B, XU Y. **Exercise improves skeletal muscle insulin resistance without reduced basal mTOR/S6K1 signaling in rats fed a high-fat diet.** Eur J Appl Physiol. 2011. 111:2743–2752.

LIRA FS, ROSA JC, PIMENTEL GD, SEELAENDER M, DAMASO AR, OYAMA LM, DO NASCIMENTO CO. **Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF- $\kappa$ B pathway in 3T3-L1 adipocytes.** Cytokine. 2012. Jan;57(1):98-106.

LIRA FS, ROSA JC, DOS SANTOS RV, VENANCIO DP, CARNIER J, SANCHES PDE L, DO NASCIMENTO CM, DE PIANO A, TOCK L, TUFIK S, DE MELLO MT, DÂMASO AR, OYAMA LM. **Visceral fat decreased by long-term interdisciplinary lifestyle therapy correlated positively with interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  and negatively with adiponectin levels in obese adolescents.** Metabolism. 2011. Mar;60(3):359-65.

LOOW S, CHIN MC, DEURENBERG-YAP M. **Review on Epidemic of Obesity.** Annals Academy of Medicine. 2009. v. 38, n.1, jan.

LUCA C, OLEFSKY JM. **Inflammation and insulin resistance.** FEBS Letters 2008. 582 97–105.

LUCIANO E, CARNEIRO EM, CARVALHO CR, CARVALHEIRA JB, PERES SB, REIS MA, SAAD MJ, BOSCHERO AC, VELLOSO LA. **Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway.** Eur J Endocrinol. 2002. 147(1):149-57.

MASTALOUDIS A, MORROW JD, HOPKINS DW, DEVARA JS, TRABER MG. **Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners.** Free Radic Biol Med. 2004. n.36, p.1329-41.

MARINHO R, ROPELLE ER, CINTRA DE, DE SOUZA CT, DA

SILVA AS, BERTOLI FC, COLANTONIO E, D'ALMEIDA V, PAULI JR. **Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss.** J Cell Physiol. 2012. Jul;227(7):2917-26.

MORROW J. **Is an oxidative stress a connection between obesity and atherosclerosis.** Arterioscler Tromb Vasc Biol. 2003. 23:368–370.

NELSON ME, REJESKI WJ, BLAIR SN, DUNCAN PW, JUDGE JO, KING AC, MACERA CA, CASTANEDA-SCEPPA C. **Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association.** Med Sci Sports Exerc. 2007. 39(8):1435-45.

NOEMAN SA, HAMOODA HE, BAALASH AA. **Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats.** Diabetol Metab Syndr. 2011. 3:17.

OGG S, PARADIS S, GOTTLIEB S, PATTERSON GI, LEE L, TISSENBAUM HA, RUVKUN G. **The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C. elegans.** Nature. 1997. 6654:994-6659.

OGDEN CL, CARROLL MD, CURTIN LR, MCDOWELL MA, TABAK CJ, FLEGAL KM. **Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004.** Journal Of the American Medical Association. 2006. 5:1549-55.

OLLER DO NASCIMENTO CM, RIBEIRO EB, OYAMA LM. **Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat.** An Acad Bras Cienc. 2009 Sep;81(3):453-66. Review.

**OMS.** Organização Mundial da Saúde. 2010. Disponível em: <http://www.who.int/en/>, Acessado em 10/09/2011.



O'GORMAN DJ, KARLSSON HK, MCQUAID S, et al. **Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes.** Diabetologia 49. 2006. 2983–2992.

PAULI JR, et al. **Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats.** J Physiol. 2008. 15;586(2):659-71.

PAULI JR, et al. **Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle.** Mech Ageing Dev. 2010. May;131(5):323-9.

PAULI JR, CINTRA DE, DE SOUZA CT, ROPELLE ER. **Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético.** Arq Bras Endocrinol Metab. 2009. 53/4.

PETERSEN AM, PEDERSEN BK. **The anti-inflammatory effect of exercise.** J Appl Physiol. 2005. 98:1154–1162.

PINHO RA, SILVA LA, PINHO CA, ET AL. **Oxidative stress and inflammatory parameters after an Ironman race.** Clin J Sport Med. 2010. 20:306-311.

PINHO R, ANDRADES ME, OLIVEIRA MR, ET AL. **Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise.** Cell Biol Int. 2006. 30:848-53.

PORTO EBS, MORAIS TW, RASO V. **Avaliação do conhecimento multidisciplinar dos futuros profissionais da propedêutica da obesidade.** Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento. 2007. v.1.n.2.67;71.

PRADA PO, HIRABARA SM, DE SOUZA CT, SCHENKA AA, ZECCHIN HG, VASSALLO J, VELLOSO LA, CARNEIRO E, CARVALHEIRA JB, CURI R, SAAD MJ. **L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity.** Diabetologia. 2007. 50(9):1949-59.

PRINS JB. **Adipose tissue as an endocrine organ.** Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2002. Dec;16(4):639-51.

RADÁK Z, KANEKO T, TAHARA S, NAKAMOTO H, OHNO H, SASVÁRI M, NYAKAS C, GOTO S. **The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes.** Free Radic Biol Med. 1999. Jul;27(1-2):69-74.

ROPELLE ER, PAULI JR, PRADA PO, DE SOUZA CT, PICARDI PK, FARIA MC, CINTRA DE, FERNANDES MF, FLORES MB, VELLOSO LA, SAAD MJ, CARVALHEIRA JB. **Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation.** J Physiol. 2006. 15;577(Pt 3):997-1007.

ROPELLE ER, PAULI JR, FERNANDES MF, ROCCO SA, MARIN RM, MORARI J, SOUZA KK, DIAS MM, GOMES-MARCONDES MC, GONTIJO JA, FRANCHINI KG, VELLOSO LA, SAAD MJ, CARVALHEIRA JB. **A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss.** Diabetes. 2008. 57(3):594-605.

ROBERGS RA, GHIASVAND F, PARKER D. **Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004. 287:R502-R516.

SAAD MJ, FOLLI F, KAHN JA, KAHN CR. **Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-**

**kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats.** The Journal of Clinical Investigation. 1993. 4: 2065-2072.

SAENGSIRISUWAN V, PEREZ FR, SLONIGER JA, MAIER T, HENRIKSEN EJ. **Interactions of exercise training and alpha-lipoic acid on insulin signaling in skeletal muscle of obese Zucker rats.** Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004. Sep;287(3):E529-36.

SARTIPY P, LOSKUTOFF DJ. **Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003. 100: 7265.

SAKURAI T, et al. **Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009. 379; 605-609.

SALBE AD, RAVUSSIN E. As Determinantes da Obesidade. In: **Claude Bouchard.** Atividade Física e Obesidade. 2002. São Paulo: Manole. (pp 80-103).

SALTIEL AR, KAHN CR. **Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.** Nature. 2001. 414: 799-806.

SHIMIZU H, OH-I S, OKADA S, MORI M. **Leptin Resistance and Obesity.** Endocrine Journal. 2007. 54 (1): 17-26.

SHEHZAD A, IQBAL W, SHEHZAD O, LEE YS. **Adiponectin:** regulation of its production and its role in human diseases. Hormones (Athens). 2012. Jan-Mar;11(1):8-20.

SCHOBER F, NEUMEIER M, WEIGERT J, WURM S, WANNINGER J, SCHÄFFLER A, DADA A, LIEBISCH G, SCHMITZ G, ASLANIDIS C, BUECHLER C. **Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release.** Biochem Biophys Res Commun. 2007. 361(4):968-73.

STEFANOVIĆ A, KOTUR-STEVIJEVIĆ J, SPASIĆ S, BOGAVAC-STANOJEVIĆ N, BUJISIĆ N. **The Influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients.** *Diabetes Res Clin Pract.* 2008. 79:156–163.

TANAKA S, et al. **High-fat diet impairs the effects of a single bout of endurance exercise on glucose transport and insulin sensitivity in rat skeletal muscle.** *Metabolism Clinical and Experimental.* 2007. 56. 1719–1728.

TILG H, HOTAMISLIGIL GS. **Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance.** *Gastroenterology.* 2006. 131:934-45

WHITE MF, KAHN CR. **The insulin signaling system.** *J Biol Chem.* 1994. Jan 7;269(1):1-4.

WULSTER-RADCLIFFE MC, AJUWON KM, WANG J, CHRISTIAN JA, SPURLOCK ME. **Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2004. 316(3):924-9.

WOJTASZEWSKI JF, HIGAKI Y, HIRSHMAN MF, MICHAEL MD, DUFRESNE SD, KAHN CR, GOODYEAR LJ. **Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice.** *J Clin Invest.* 1999. 104(9):1257-64.

YAMASHITA AS, LIRA FS, ROSA JC, PAULINO EC, BRUM PC, NEGRÃO CE, DOS SANTOS RV, BATISTA ML JR, DO NASCIMENTO CO, OYAMA LM, SEELAENDER M. **Depot-specific modulation of adipokine levels in rat adipose tissue by diet-induced obesity: the effect of aerobic training and energy restriction.** *Cytokine.* 2010 Dec;52(3):168-74

YAMAMOTO Y, HIROSE H, SAITO I, TOMITA M, TANIYAMA M, MATSUBARA K, OKAZAKI Y, ISHII T, NISHIKAI K, SARUTA T. **Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population.** Clin Sci (Lond). 2002. Aug;103(2):137-42.

YAMAUCHI T, KAMON J, WAKI H, TERAUCHI Y, KUBOTA N, HARA K, MORI Y, IDE T, MURAKAMI K, TSUBOYAMA-KASAOKA N. **The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity.** Nature Medicine 2001. 7 941–946.

VAZIRI ND. **Roles of oxidative stress and antioxidant therapy in chronic kidney disease and hypertension.** Current Opinion Nephrology Hypertension. 2004. v.13, n.1, p.93-99.

VIUNUSKI N. **Obesidade Infantil.** Pediatria Atual. 1994. 7(8).

ZOPPI CC. **Mecanismos moleculares sinalizadores da adaptação ao treinamento físico.** Rev.Saúde. 2005. 1(1):60-70.

## **ANEXOS**

**ARTIGO I****Exercise training and reducing of adipose tissue in high-fat-fed mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis**

Joni Márcio de Farias, Karoliny Farias Bom, Camila Baumer Tromm, Thais Fernandes Luciano, Talita Tuon, Luciano Acordi Silva, Fábio Santos Lira, Claudio Teodoro de Souza, Ricardo Aurino Pinho.

**Corresponding author:** Ricardo A. Pinho, PhD. Laboratory of Exercise Biochemistry and Physiology, Postgraduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

Phone/Fax: + 55 48 3431-2773 / e-mail: pinho@unesc.net

**Filiations:** Laboratory of Exercise Biochemistry and Physiology, *Postgraduate Program in Health Sciences*, Health Sciences Unit, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806000, Criciúma, SC, Brazil.

**Submetido ao periódico: Hormone and Metabolic Research**

## ABSTRACT

**Background:** It is well known that high fat diets (HFDs) induce obesity and an increase in oxidative stress in adipose tissue, which leads to impair fat mobilization by down-regulating the lipases, such as hormone sensitive lipase (HSL), adipose triglyceride lipase (ATGL). On the other hand, exercise training leads to reduce adipose tissue and improves antioxidant status and lipolytic pathway. **Aim:** Our aim was to examine the influence of exercise moderate intensity training upon oxidative stress parameters and relation between proteins involved in the lipolysis in animals to high-fat-fed diet. **Methods:** Twenty-four mice were used and divided into four groups (n=6): standard diet (SD); standard diet plus exercise (SD+Ex); high-fat diet (HFD); high-fat diet plus exercise (HFD+Ex). The animals received HFD for 90 days and submitted to a daily training protocol in swimming. Animals were euthanized 48 hours after the last session of exercise. White adipose tissue epididymal fat was surgically excised for measurement of oxidative stress parameters. **Results:** The results show an increase in body weight after 90 days HFD, and exercise training prevented great gain. In adipose tissue lipid peroxidation and protein carbonylation increased after HFD and decreased significantly after exercise training. Protein level of CGI-58 was reduced and FAS was increased in the HFD than SD, while ATGL exhibited increase ( $p < 0.05$ ) than HFD and SD. **Conclusion:** The exercise has an important role in reducing oxidative damage, together in the regulation of proteins involved in lipolysis in animals exposed to HFD.

**Key-words:** Exercise training, high-fat diet, epididymal fat, oxidative stress, lipolysis



## INTRODUCTION

Obesity is a public health problem that affects individuals of all social classes, gender and age. Genetic predisposition, several environmental and behavioral factors are associated with pathophysiology of obesity, and are recognized as a risk factor for lifestyle-related disease, like cardiovascular disease and diabetes [1].

Studies have suggested that obesity is associated with changes in gene expression in adipocytes with different metabolic pathways and in different organs and tissues, resulting in various metabolic actions and molecular signals [2] and is closely associated with low-grade chronic inflammatory response [3]. These biochemical and molecular changes involves the participation of a number of molecules as transcription factors, inflammatory mediators and the formation of reactive oxygen species (ROS).

ROS are chemically-reactive molecules produced during normal metabolism of oxygen and have important roles in cell signaling and homeostasis. However, ROS levels can increase dramatically due to several stimuli, and this may result in significant damage to cell structures [4]. Several studies show the involvement of ROS with the pathophysiology of obesity [3,5,6,7] and suggest that excessive ROS formation resulting in oxidative stress and inflammation provide important changes in gene expression of adipocytes lipid metabolism and content of adipocytes.

Adipose tissue fat stores are mainly dependent upon fatty acid (FA) supply, FA esterification to triglycerides (TG), and TG breakdown, or lipolysis. Adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) both have the capacity to TG degradation by cleaving the ester bond, governing lipolysis pathway in adipose tissue [8]. Adipose tissue lipolysis has received much attention over the past 10 years because of its altered regulation in obesity.

Exercise training has been used as an important therapeutic resource to treat and prevent various diseases. It's know that exercise training leads reduce body weight, adipose tissue depots via regulation of lipases, and induces anti-inflammatory and antioxidant profile [9,10,11].

More recently, Krawczyk et al. [12] have postulate of contributes oxidative stress in the control lipolysis in the adipose tissue. However, this interaction was never examined in obese animals submitted exercise training protocol. Here, we examined the molecular and biochemical mechanisms involved in obesity, investigates oxidative

stress parameters and proteins involved in lipolysis in adipose tissue, and exploring effects exercise training as a therapy non-pharmacology.

## **MATERIAL AND METHODS**

*Sample:* Twenty-four 2-month-old male Swiss mice from the colony maintained by the Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, Santa Catarina, Brazil were used in this study. Animals were randomized into four groups (n=6): standard diet (SD); standard diet plus exercise (SD+Ex); high-fat diet (HFD); high-fat diet plus exercise (HFD+Ex). They were housed four per cage in an animal room under a 12 h light-dark cycle at  $22 \pm 1$  °C and  $60 \pm 5\%$  humidity and received a chow diet and water ad libitum. The experiments were carried out after a one week acclimation period. All procedures were conducted in accordance with regulation no. 11794/08 (DOU 196, Section 1, October 2008) and approved by the local ethics committee.

*Diet and exercise protocol:* Composition of the experimental diet was according to Noeman and colleagues [7]. The diet applied was purchased from Nuvital Nutrientes SA, Brazil (Table 1). All animals had free access to water and food for 90 days. Thirty days after starting high-fat diet, animals were submitted to a daily training protocol in water (2X30 minute with 5-minute interval), five days per week for eight weeks. Training was conducted in a 120 x 60 x 50 cm pool with 10 x 15 x 50 cm lanes and containing 37.5 cm<sup>3</sup> water with temperature controlled at 30-32°C. After 4 weeks, a tail weight (5% of body weight) was used to increase intensity of training.

*Weight control:* Body weight was measured during all experimental period using a precision semi-analytic balance (Gehaka model BK300, precision 0.01 g).

*Euthanasia:* Forty-eight hours after the last exposure session, mice were killed by cervical dislocation and adipose tissue of visceral regions (epididymal fat) were surgically excised. After, an aliquot of these tissues was homogenized in specific buffer and used for biochemical analyses and intracellular proteins by western blot. The remaining material was stored in a freezer at -80°C for further analysis.

*Homogenization of sample for western blotting:* The sample were homogenized in buffer containing 1% Triton X 100, Tris 100 mM (pH 7.4), sodium pyrophosphate 100 mM, EDTA 100 mM, sodium vanadate

10 mM, PMSF 2 mM and aprotinin 0.1 mg/mL at 4°C. The homogenate was then centrifuged at 11,000 rpm for 40 min. The supernatant was used to determine the concentration of protein, and later, total extract was determined in the same material, using specific antibody.

*Western blotting:* Aliquots containing 250 µg protein (per sample) were applied on 1.5-mm-thick polyacrylamide gel. Electrophoresis was conducted in a minigel cell (Bio Rad, Mini-Protean) with electrophoresis buffer previously diluted. SDS-PAGE was initially conducted at 25 V (upon the stacking gel) and 120 V (until the end of the resolution gel). Next, proteins separated by SDS-PAGE were transferred to a nitrocellulose membrane using an electrotransference minigel device (Bio Rad) and the running buffer solution was kept at 120 V for 2 h under continuous refrigeration using ice. Nitrocellulose membranes containing run proteins were incubated in blocking solution for 2 h at room temperature to reduce the non-specific protein ligation. Then, membranes were washed thrice (for 10 min each time) in wash buffer and incubated in specific antibodies (anti-superoxide dismutase (SOD), anti-catalase (CAT), anti-ATGL - adipose triglyceride lipase (ATGL), anti-CGI-58, comparative gene identification 58 (CGI-58), anti-FAS – fatty acid synthase antibodies under constant shaking overnight at 4°C. Next, membranes were washed again thrice (for 10 min each time) in wash buffer and incubated in secondary antibody conjugated with peroxide for 2 h at room temperature. Excess secondary antibody was washed with wash buffer and then membranes were incubated in enzyme substrate for 2 min and exposed to an X-ray film (Kodak XAR, Rochester, NY) with intensifier (Cronex Lightning Plus, DuPont, Wilmington, DE) in a radiography cassette. Band intensity was determined by reading radiographies developed by optic densitometry using a scanner (HP 3400) and the Scion Image software (Scion Corporation).

*Antioxidant enzyme activities:* Superoxide dismutase (SOD) activity was determined according to the method of Bannister and Calabrese [13]. The enzymatic activity estimation occurs by adrenaline auto-oxidation inhibition read at 480 nm in a spectrophotometer. Enzyme activity was expressed as U/mg protein. To determine catalase (CAT) activity, the sample was sonicated in a 50 mM phosphate buffer and the resulting suspension was centrifuged at 3000 g for ten minutes. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity was measured using the rate

of decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm, determined according to the method of [14]. Enzyme activity was expressed as U/mg protein.

*Oxidative damage:* Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) was measured as a marker of lipid peroxidation by spectrophotometry at 532 nm. Results were expressed as nmol TBARS / mg protein [15] and the generation of carbonyl groups in the reaction with dinitrophenylhydrazine was used as marker of oxidation of proteins. Carbonyl content was determined by spectrophotometry at 370 nm with a coefficient of 22.000 molar<sup>-1</sup> and expressed as nmol/ mg protein [16].

*Protein content:* Protein content was assayed using bovine serum albumin as standard. A folin phenol reagent (phosphomolybdic-phosphotungstic reagent) was added to bind the protein. The bound reagent was slowly reduced and changed from yellow to blue. Absorbance was read at 750 nm [17].

*Statistical analysis:* Data were expressed as mean and standard deviation and analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test in the Statistical Package for Social Sciences (SPSS 16.0). Significance level was defined as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

*Body weight:* Table 2 shows body weight after exposure to high-fat diet and exercise training protocol. Body weight in the HFD showed increased 37% ( $p<0.001$ ), while HFD+Ex exhibited increased 15% ( $p<0.05$ ) when compared with SD. In addition, HFD+Ex exhibits body weight 19% minor ( $p<0.05$ ) in relation HFD.

*Antioxidant enzymes:* Figure 1A and 1B show that SOD activity and level changed after exercise training in animals exposure to HFD. SOD level in adipose tissue showed increased in HFD ( $p<0.05$ ) in relation SD, while HFD+Ex group showed increase in SOD activity in relation to SD, HFD and SD+Ex ( $p<0.05$ ). In relation to CAT (figure 2A and 2B), the results showed increase in activity in the HFD+Ex in relation HFD ( $p<0.05$ ), while protein level of enzyme in adipose tissue was increased in HFD+Ex group in relation to SD, HFD and SD+Ex ( $p<0.05$ ).

*Oxidative damage:* Figure 3A and 3B show values of TBARS and carbonyl protein. In the adipose tissue the lipid peroxidation and protein oxidation were significantly increased in the HFD ( $p<0.01$ ) in relation SD group. In contrast, exercise training leads decreased both parameters ( $p<0.01$ ).

*Lipolytic and lipogenic proteins:* Figure 4A to 4C show data of ATGL, CGI-58 and FAS, respectively. ATGL protein levels were increased in the HFD+Ex ( $p<0.05$ ) in relation all groups. CGI-58 protein levels was reduced all groups ( $p<0.05$ ) in relation SD groups. FAS protein levels increased in the HFD ( $p<0.05$ ) in relation SD and HFD+Ex groups, while shown decreases in the SD+Ex and HFD+Ex ( $p<0.05$ ) than SD group.

## DISCUSSION

Our results indicate that the obesity induces great alterations on several biochemical and molecular parameters in adipose tissue while physical training rebalanced these alterations, improving antioxidant profile and increasing ATGL protein level, which induces minor weight gain. Here, we demonstrated that, least in part, changes oxidative stress is associated with lipolysis process in adipose tissue in high fat fed mice.

Obesity is closely associated with ROS and studies have shown that the unbalance between oxidant production and antioxidant defense

system is critically involved in the pathogenesis of obesity in human [5,6] and experimental model [7,18].

It has been reported that obesity may induce systemic oxidative stress and, oxidative stress is associated with overproduction of proinflammatory adipokines [19]. In contrast, antioxidant defense markers are lower according to the amount of body fat [20,21]. Our data corroborated with found in the literature, shown that adipose tissue in high fat fed diet mice exhibits increase ROS concentrations [22].

The increase in obesity-associated ROS is probably due to relation between obesity and chronic inflammation, because adipocytes and preadipocytes have been identified as a source of proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 [23,24] and these cytokines are potent stimulators for the production of ROS by macrophages and monocytes [25]. In addition, is observed disruption in lipolysis pathway, leads accumulated TAG in adipose tissue, which favor increases this tissue and aggravates of obesity.

Lipolysis is coordinated by lipases. Adipocyte triglyceride lipase (ATGL) and hormone sensitive lipase (HSL) assume the triglyceride hydrolase activities in adipose tissue. Lipolysis typically occurs through catecholamine-stimulation of  $\beta$ -adrenergic receptors and the subsequent activation of protein kinase A (PKA) [26]. In mice, inhibiting HSL and ATGL has been shown to promote diet induced obesity and its associated metabolic defects [27]. In humans, both HSL and ATGL protein level are decreased in adipose tissue from obese patients compared to lean individual [28,29].

Our data showed that FAS protein level is increased in the adipose tissue in high fat fed diet mice, favor synthesis fatty acids, while there were no changes in ATGL protein level. Taken together, our data demonstrated that increases ROS is accompanied by disruption lipolysis process in the adipose tissue high fat fed diet mice.

On the other hand, exercise training has been associated with improvement in the antioxidant defense system and decrease in oxidative damage in brain [30], lung [31], liver [32], muscle [33], kidney [34], heart [35], adipose tissue [3] and other tissues as well as the reduction in obesity [36,37].

In the present study, we demonstrated that exercise training prevents marked weight adipose tissue gain, oxidative damage and recovery ATGL protein level in adipose tissue. These data suggest that, protector effects exercise training have a link between reduced ROS and lipolysis pathway. This interaction have been recently postulated by Krawczyk et al. [12], which demonstrated that ROS facilitate

translocation of HSL to the lipid droplet during lipolysis in human adipocytes.

Intracellular antioxidant enzymes play an important role in cellular antioxidant defenses. SOD and CAT are the two major scavenging enzymes that remove radicals *in vivo* and a decrease in activity of these enzymes can lead to an excess availability of superoxide anion and hydrogen peroxide, which in turn generate hydroxyl radicals, resulting in initiation and propagation of lipid peroxidation and protein modification [4].

We observed that there was a different modulation of SOD and CAT in the adipose tissue in trained animals, when compared to untrained animals. The results suggest that SOD seems to be highly modulated by exercise training. The most striking finding was the remarkable increase in SOD activity and protein levels observed in trained rats without a proportional increase in CAT activity. SOD reduces superoxide radical to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), which is the substrate to CAT. When the cell has increased levels of SOD without a proportional increase in peroxidases, cells face a peroxide overload challenge [4]. However, the reduction of CAT in adipose tissue may be due to rapid consumption and exhaustion of storage of this enzyme in fighting free radicals generated during development of obesity [7], although the increase in activity was an expected result. This result may be one factor responsible for increased oxidative damage, and exercise training minimized these effects. The decrease in catalase can lead to redox imbalance and can accumulate peroxide reacting with transitional metals, generating the radical hydroxyl, which is the most harmful radical. This may explain the observed increase in oxidative damage after HFD.

Exercise training was sufficiently able to prevent the increase in the levels of lipid peroxidation and protein oxidation. According to Petersen and Pedersen [9], exercise exerts an anti-inflammatory effect by inducing increased levels of IL-6. IL-6 induces an anti-inflammatory environment by inducing the production of IL-1ra and IL-10, but it also inhibits TNF- $\alpha$  production [38,39,40]. In addition, exercise training appears to attenuate NADPH oxidase activity as a result of elevated eNOS production and other factors [41]. In a recent study, Sakurai and colleagues [3] verified the effects of exercise training on oxidative stress in rats with adipose tissue, especially focusing on inflammation-related adipokines. The results showed a reduction in oxidative damage and an increase in SOD content induced by exercise training. In addition, the study also showed a decrease in the expression of NADPH oxidase, and

the authors suggests that this reduction is associated with lower oxidative damage in exercised animals.

In relation lipolysis, was observed that great elevation in protein expression ATGL in HFD+Ex. The data corroborate with minor weight adipose tissue gain in the exercised groups that, least in part, recovery lipolysis process. Chapados et al. [42] have showed that physical training decreases *in vitro* stimulated lipolysis in a visceral but not in the retroperitoneal fat depot of high fat fed rats. The authors showed that the elevation in stimulated lipolysis was reduced by training in high fat fed rats might, at first glance, simply reflect a reduction in fat mass in the adipose tissue.

In summary, the results of this study suggest that antioxidant enzymes have an important role in the regulation of obesity, but are not sufficient to reduce oxidative damage induced by exposure to HFD. However, since we did not determine anti-inflammatory cytokines and NAPH oxidase, the exact role of physical training in the modulation of oxidative stress in animals exposed to HFD should be confirmed in future studies.

### **Conflict of Interest**

The authors declared no conflict of interest.

### **Acknowledgment**

This research was supported by CNPq/MCT (Brazil), CAPES/MEC (Brazil), FAPESC (Brazil) and UNESC (Brazil).

### **REFERENCES**

- [1] Blakemore, A.I.F., and Froguel, P. 2008. Is Obesity Our Genetic Legacy? *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 93 (11 Suppl 1): S51–S56.
- [2] Attie, A.D., and Scherer, P.E. 2009. Adipocyte metabolism and obesity. *J Lipid Res.* 50: S395-S399.
- [3] Sakurai, T., Izawa, T., Kizaki, T., Ogasawara, J.E., Shirato, K., Imaizumi, K., Takahashi, K., Ishida, H., and Ohno, H. 2009. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379(2): 605-609.
- [4] Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free Radical in Biology Medicine.* (University Press). Oxford: New York, pp. 187-267.



- [5] Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., and Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114(12): 1752-1761.
- [6] Stefanović, A., Kotur-Stevuljević, J., Spasić, S., Bogavac-Stanojević, N., and Bujisić, N. 2008. The Influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 79(1): 156–163.
- [7] Noeman, S.A., Hamooda, H.E., and Baalash, A.A. 2011. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* 3(1):17.
- [8] Bezaire V, Mairal A, Ribet C, Lefort C, Girousse A, Jocken J, Laurencikienė J, Anesia R, Rodriguez AM, Ryden M, Stenson BM, Dani C, Ailhaud G, Arner P, Langin D. Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):18282-91.
- [9] Petersen, A.M., and Pedersen, B.K. 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* 98(4): 1154–1162.
- [10] Pinho, R., Andrades, M.E., Oliveira, M.R., Pirola, A.C., Zago, M.S., Silveira, P.C., Dal-Pizzol, F., and Moreira, J.C. 2006. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol. Int.* 30(10): 848-853.
- [11] Lira FS, Rosa JC, Yamashita AS, Koyama CH, Batista ML Jr, Seelaender M. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF-alpha ratio in rat adipose tissue. *Cytokine.* 2009 Feb;45(2):80-5.
- [12] Krawczyk SA, Haller JF, Ferrante T, Zoeller RA, Corkey BE. Reactive oxygen species facilitate translocation of hormone sensitive lipase to the lipid droplet during lipolysis in human differentiated adipocytes. *PLoS One.* 2012;7(4):e34904
- [13] Bannister, J.V., and Calabrese I. 1987. Assay for SOD. *Methods Biochem. Anal.* 32: 279-312.
- [14] Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.

- [15] Draper, H.H., and Hadley, M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186: 421-431.
- [16] Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., and Stadtman E.R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464-478.
- [17] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, J.R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275.
- [18] Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A.I., and Nieto, N. 2005. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J.* 19(1): 136-138.
- [19] Esposito K, Giugliano G, Scuderi N, Giugliano D. Role of adipokines in the obesity-inflammation relationship: the effect of fat removal. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Sep 15;118(4):1048-57; discussion 1058-9. Review.
- [20] Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas J, Economou M, Papadimitriou L, Stefanadis C. The association between pre-hypertension status and oxidative stress markers related to atherosclerotic disease: the ATTICA study. *Atherosclerosis.* 2007 May;192(1):169-76.
- [21] Hartwich J, Góralaska J, Siedlecka D, Gruca A, Trzos M, Dembinska-Kiec A. Effect of supplementation with vitamin E and C on plasma hsCRP level and cobalt-albumin binding score as markers of plasma oxidative stress in obesity. *Genes Nutr.* 2007 Oct;2(1):151-4
- [22] Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond).* 2006 Mar;30(3):400-18. Review.
- [23] Oller do Nascimento CM, Ribeiro EB, Oyama LM. Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat. *An Acad Bras Cienc.* 2009 Sep;81(3):453-66. Review.
- [24] Yamashita AS, Lira FS, Rosa JC, Paulino EC, Brum PC, Negrão CE, dos Santos RV, Batista ML Jr, do Nascimento CO, Oyama LM, Seelaender M. Depot-specific modulation of adipokine levels in rat

adipose tissue by diet-induced obesity: the effect of aerobic training and energy restriction. *Cytokine*. 2010 Dec;52(3):168-74

[25] Morrow, J. 2003. Is an oxidative stress a connection between obesity and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23(3): 368–370.

[26] Marcelin G, Chua S Jr. Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Oct;10(5):588-93.

[27] Haemmerle G, Zimmermann R, Zechner R. Letting lipids go: hormone-sensitive lipase. *Curr Opin Lipidol*. 2003 Jun;14(3):289-97. Review.

[28] Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Rydén M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguier N, van Harmelen V, Gross RW, Holm C, Arner P. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes*. 2005 Nov;54(11):3190-7

[29] Watt MJ, Steinberg GR. Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem J*. 2008 Sep 15;414(3):313-25. Review.

[30] Tuon, T., Valvassori, S.S., Lopes-Borges, J., Fries, G.R., Silva, L.A., Kapczinski, F., Quevedo, J., and Pinho, R.A. 2010. Effects of moderate exercise on cigarette smoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice. *Neurosci. Lett.* 475(1): 16-19.

[31] Menegali, B.T., Nesi, R.T., Souza, P.S., Silva L.A., Silveira P.C., Valença S.S., and Pinho R.A. 2009. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 22(6): 567-573.

[32] Silva, L.A., Pinho, C.A., Rocha, L.G., Tuon, T., Silveira, P.C., and Pinho, R.A. 2009. Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver. *Appl. Physiol. Nutr. Metabol.* 34(1): 60-65.

- [33] Silva, L.A., Pinho, C.A., Scarabelot, K.S., Fraga, D.B., Volpato, A.M., Boeck, C.R., De Souza, C.T., Streck, E.L., and Pinho, R.A. 2009. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*. 105(6): 861-867.
- [34] Coelho, B.L., Rocha, L.G., Scarabelot, K.S., Scheffer D.L., Ronsani M.M., Silveira P.C., Silva L.A., Souza C.T., and Pinho R.A. 2010. Physical exercise prevents the exacerbation of oxidative stress parameters in chronic kidney disease. *J. Renal Nutr.* 20(3): 169-175.
- [35] Frederico, M.J., Justo, S.L., Da Luz, G., Da Silva S., Medeiros C., Barbosa V.A., Silva L.A., Boeck C.R., De Pinho R.A., and De Souza C.T. 2009. Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol. *Free Radic. Res.* 43(10): 957-694.
- [36] Gomez-Cabrera, M.C., Domenech, E., and Vina, J. 2008. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic. Biol. Med.* 44(2): 126–131.
- [37] Buettner, R., Schölmerich, J., and Bollheimer, C.L. 2007. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity*. 15(4): 798–808.
- [38] Pinho, R.A., Silva, L.A., Pinho, C.A., Scheffer, D.L., Souza, C.T., Benetti, M., Carvalho, T., and Dal-Pizzol, F. 2010. Oxidative stress and inflammatory parameters after an Ironman race. *Clin. J. Sport Med.* 20(4): 306-311.
- [39] Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Aug 5;11(9):607-15.
- [40] Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Apr 3. doi: 10.1038/nrendo.2012.49. [Epub ahead of print]

[41] Jenkins, N.T., Witkowski, S., Spangenburg, E.E., and Hagberg J.M. 2009. Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide in putative endothelial progenitor cells: role of NAPDH oxidase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297(5): H1798-1805.

[42] Chapados N, Collin P, Imbeault P, Corriveau P, Lavoie JM. Exercise training decreases in vitro stimulated lipolysis in a visceral (mesenteric) but not in the retroperitoneal fat depot of high-fat-fed rats. *Br J Nutr.* 2008 Sep;100(3):518-25

### **Legends**

Table 1: Composition of high-fat diet (HFD) and standard diet (SD).

Table 2: Body weight and training control (blood lactate level, mmol/L) of mice exposed to physical training and to high-fat diet (HFD) and standard diet (SD). Values are presented as mean  $\pm$  SEM and  $p < 0.05$  was considered as minimum significance between the groups. \* different from standard diet (SD), # different from high-fat diet (HFD) and \$ different from standard diet plus exercise (SD+Ex).

Figure 1: Activity and level of superoxide dismutase in epididymal fat (1A and 1B) of mice submitted to training after exposure to high-fat diet. Values are presented as mean  $\pm$  SEM and  $p < 0.05$  was considered as minimum significance between the groups. \* different from standard diet (SD), # different from high-fat diet (HFD) and \$ different from standard diet plus exercise (SD+Ex).

Figure 2: Activity and level of catalase in epididymal fat (2A and 2B) of mice submitted to training after exposure to high-fat diet. Values are presented as mean  $\pm$  SEM and  $p < 0.05$  was considered as minimum significance between the groups. \* different from standard diet (SD), # different from high-fat diet (HFD) and \$ different from standard diet plus exercise (SD+Ex).

Figure 3: TBARS level (3A) and carbonyl content (3B) in epididymal fat of mice submitted to training after exposure to high-fat diet. Values are presented as mean  $\pm$  SEM and  $p < 0.05$  was considered as minimum significance between the groups. \* different from standard diet (SD), # different from high-fat diet (HFD) and \$ different from standard diet plus exercise (SD+Ex).

Figure 4: Levels of adipose triglyceride lipase (ATGL), comparative gene identification 58 (CGI-58) and fatty acid synthase (FAS) in epididymal fat of mice submitted to training after exposure to high-fat diet. Values are presented as mean  $\pm$  SEM and  $p < 0.05$  was considered as minimum significance between the groups. \* different from standard diet (SD), # different from high-fat diet (HFD) and \$ different from standard diet plus exercise (SD+Ex).

### Anexos

**Table 1:** Components of diet

	<b>HFD</b>	<b>SD</b>
<b>Fat</b>		
Corn oil	25.5	5%
Beef tallow	20.5	-
<b>Carbohydrates</b>		
Cornstarch	6	15%
Sucrose	18	50%
<b>Proteins</b>		
Casein	20%	20%
DL-Methionine	3.3%	3.3%
<b>Others</b>		
Fiber	4%	4%
Salt mixture	1.7%	1.7%
Vitman mixture	1%	1%

**Table 2:** Body weight and training control

Groups	Body weight (mg) Mean±EPM	Blood lactate (nmol/L) Mean±EPM			
		Basal	1 <sup>th</sup> session	20 <sup>th</sup> session	Last session
SD	40.43±1.08	2.13±0.19	-	-	-
HFD	55.29±2.00*		-	-	-
SD+Ex	37.14±0.90		3.92±0.13*	4.27±0.25*	4.13±0.27*
HFD+Ex	46.88±1.83* <sup>S</sup>		4.10±0.10*	4.60±0.20*	4.48±0.28*

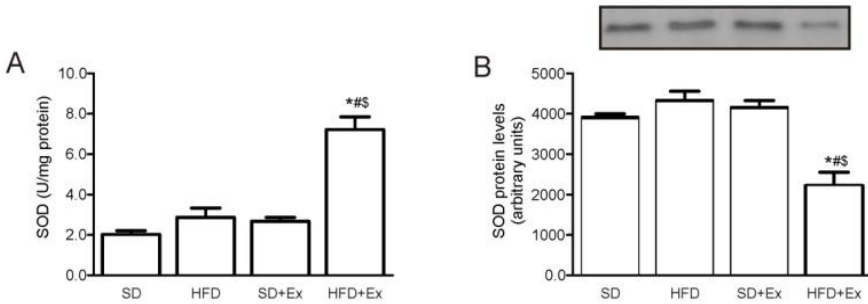
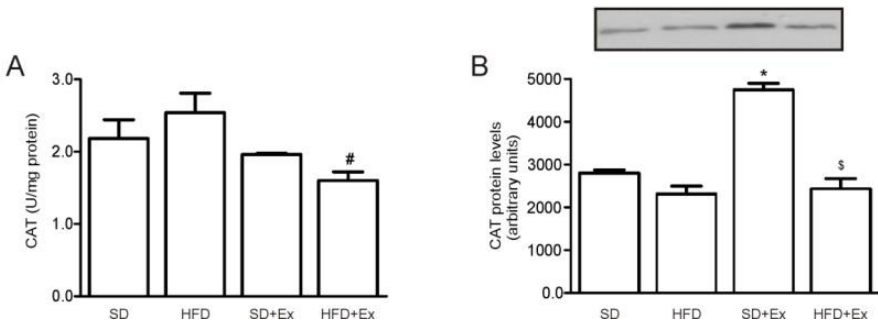
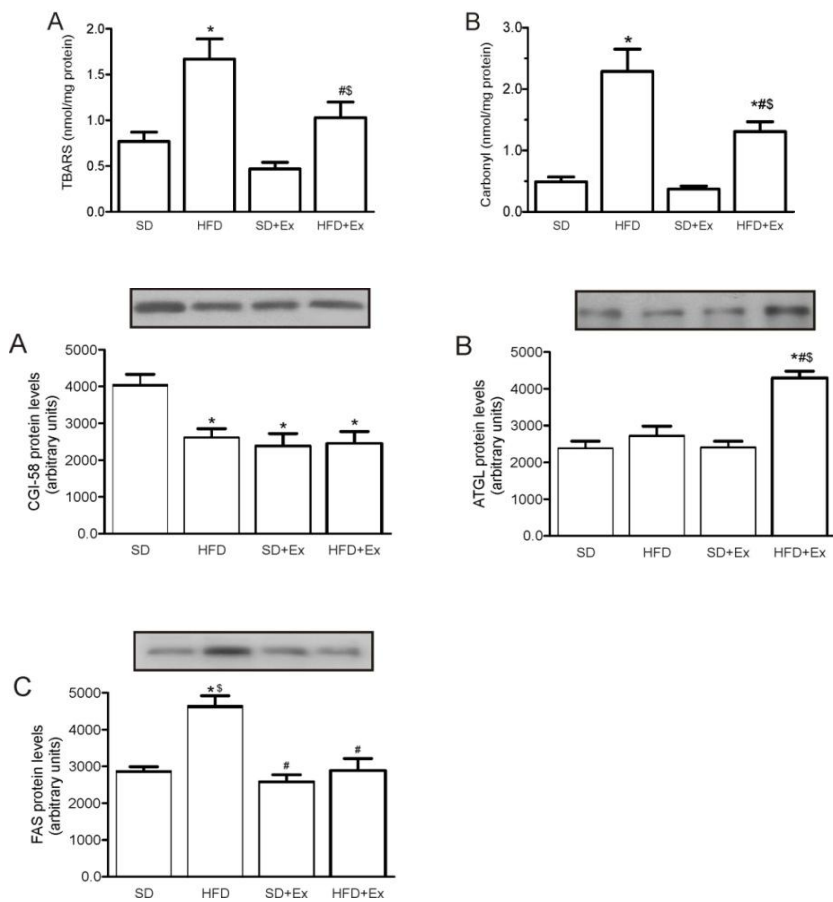
**Figure 1****Figure 2**

Figure 3





**ARTIGO II**

**Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adiponectin/APPL1 protein levels in mice.**

Joni Marcio de Farias, Rosana Mengue Maggi, Camila Baumer Tromm, Luciano Acordi da Silva, Thais F Luciano, Scherolin O Marques, Fabio Santos Lira, Claudio Teodoro de Souza, Ricardo Aurino Pinho.

Laboratory of Exercise Biochemistry and Physiology, Postgraduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806000, Criciúma, SC, Brazil.

**Running title:** Concurrent exercise improves insulin signaling

**Corresponding author:** Ricardo A. Pinho, PhD. Laboratory of Exercise Biochemistry and Physiology, Postgraduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil.

Phone/Fax: + 55 48 3431-2773 / e-mail: [pinho@unesc.net](mailto:pinho@unesc.net).

## ABSTRACT

**Introduction:** The aim of the present study was to evaluate the protective effect of concurrent exercise in the degree of the insulin resistance in mice fed with a high-fat diet, and assess adiponectin receptors (ADIPOR1 and 2) and endosomal adaptor protein APPL1 in different tissues.

**Methods:** Twenty-four mice were randomized into four groups (n=6): chow standard diet and sedentary (C); chow standard diet and simultaneous exercise training (C-T); fed on a high-fat diet and sedentary (DIO); and fed on a high-fat diet and simultaneous exercise training (DIO-T). Simultaneously to starting high-fat diet feeding, the mice were submitted to a swimming exercise training protocol (2 x 30 minutes, with 5 minutes of interval/day), five days per week, for twelve weeks (90 days). Animals were then euthanized 48 hours after the last exercise training session, and adipose, liver, and skeletal muscle tissue were extracted for an immunoblotting analysis.

**Results:** IR, IRs, and Akt phosphorylation decreased in the DIO group in the three analyzed tissues. In addition, the DIO group exhibited ADIPOR1 (skeletal muscle and adipose tissue), ADIPOR2 (liver), and APPL1 reduced when compared with the C group. However, it was reverted when exercise training was simultaneously performed. In parallel, ADIPOR1 and 2 and APPL1 protein levels significantly increase in exercised mice.

**Conclusions:** Our findings demonstrate that exercise training performed concomitantly to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adipoR1-2/APPL1 protein levels in the hepatic, adipose, and skeletal muscle tissue.

**Key-words:** exercise, obesity, high-fat diet, insulin resistance.

### List of abbreviations:

ADIPOR1: adiponectin receptor 1

ADIPOR2: adiponectin receptor 2

APPL1: endosomal adaptor protein 1

DIO: diet induces obesity

IR: insulin receptor

IRS-1: insulin receptor substrate 1

IRS-2: insulin receptor substrate 2

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

Akt: protein kinase B

DM2: diabetes mellitus type 2

## Introduction

Obesity has been linked to genetic factors, inadequate level of physical activity, and dietary aspects such as food availability, among others [1]. Overweight and obesity result from a complex interaction between genetic, metabolic, behavioral, and environmental factors. High-calorie intakes, lowered energy expenditures, or a combination thereof lead to a positive energy balance and marked weight gain [2]. From the clinical standpoint, *obesity* is defined as a state of high body weight, more specifically of adipose tissue, that is intense enough to have adverse consequences on health [3], among which is diabetes mellitus type 2 (DM2). The link between obesity and DM2 is insulin resistance. Nevertheless, the relationship between obesity and insulin resistance is a result of changes in the insulin signal transduction pathway, with a decrease in kinase activity of insulin receptor (IR), insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS1, IRS2), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), or both.

Insulin receptor is a protein with endogenous tyrosine kinase activity that, after activation by insulin, undergoes rapid autophosphorylation and subsequently phosphorylates intracellular protein substrates, including IRS1 and 2[4]. IRS proteins act as messenger molecule-activated receptors to signaling with Src homology 2 domains, which are important steps in insulin action. After stimulation by insulin, IRS1 and 2 associate with several proteins, including PI3K [5-7]. Downstream to PI3K, the serine/threonine kinase, Akt, is activated and plays a pivotal role in the regulation of various biological processes, including apoptosis, proliferation, differentiation, and intermediary metabolism [8,9]. However, live substances such as adiponectin [10-12] serve as well-documented insulin sensitizers.

Adiponectin, an adipokine secreted by the white adipose tissue, plays an important role in regulating glucose and lipid metabolism and controlling energy homeostasis in insulin-sensitive tissues [for review see 13]. Adiponectin exerts its effects through two membrane receptors, AdipoR1 and AdipoR2. Endosomal adaptor protein (APPL1) is the first identified protein that interacts directly with its receptors. The PTB domain of APPL1 interacts directly with the intracellular region of adiponectin receptors [14]. Through this interaction, APPL1 mediates adiponectin signaling and its effects on metabolism. APPL1 also functions in the insulin-signaling pathway and is an important mediator of adiponectin-dependent insulin sensitivity in skeletal muscle, adipose tissue, liver, and other organs [14]. Hence, APPL1 plays a critical role in the cross-talk between adiponectin- and insulin signaling pathways.

Acute or chronic exercise has been showed to induce numerous metabolic and hemodynamic factors that can contribute to the improvements in glucose homeostasis in individuals with insulin resistance [15-18]. These adaptive responses include enhanced insulin action on the skeletal muscle glucose transport system, reduced hormonal stimulation of hepatic glucose production, improved blood flow to skeletal muscle, and normalization of an abnormal blood lipid profile. In fact, the beneficial effects of an acute bout of exercise and of chronic exercise training on insulin action in insulin-resistant states are well established. Our group and other groups have demonstrated that the accomplishment of exercise (chronic and acute) improves insulin resistance; therefore, exercise protocols are performed when the diet-induced obesity (reversal treatment manner) is always installed in mice and rats [19-24]. In addition, Marinho and colleagues [25] have shown the involvement of APPL1 in the improvement of insulin resistance in the liver of exercise training mice. Few are knowledgeable about the efficacy of exercise training on insulin signaling/insulin resistance when applied simultaneously to the onset of a high-fat diet. Thus, the aim of this study was to investigate whether the exercise training, performed simultaneously, will reduce the degree of high-fat, diet-induced, insulin-resistant food and whether it was related to adiponectin receptors and APPL1 protein levels in the adipose tissue, skeletal muscle, and liver of mice.

## **Methods**

### *Animals*

Twenty-four 2-month-old male Swiss mice from the colony maintained by the Universidade do Extremo Sul Catarinense [UNESC], Criciúma, Santa Catarina, Brazil, were used in this study. The animals were randomized into four groups (n = 6): (i) control – chow standard diet and sedentary [C]; (ii) control – chow standard diet and concomitant exercise training (C-T); (iii) mice fed on a high-fat diet and sedentary (DIO); and (iv) mice fed on a high-fat diet and concomitant exercise training (DIO-T). The environment was maintained at 70% relative humidity and  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  and under a 12-h dark:light cycle. All procedures were conducted in accordance with regulation n°. 11794/08 (DOU 196, Section 1, October 2008) and approved by the local ethics committee.

### *Diet and exercise protocol*

The composition of the experimental diet was according to De Souza and colleagues [26] and was purchased from Nuvital Nutrientes

SA, Brazil (Table 1). All animals had free uninterrupted access to water and food for 90 days. Simultaneously to starting high-fat diet feeding, the mice were submitted to swimming exercise training (2 x 30 minutes, with 5 minutes of interval/day), five days per week, for twelve weeks (1 week adaptation and 11 weeks exercise training periods). The mice were adapted to swimming for 20 min on the first day; 30 min on the second day, until they reached 60 minutes daily (1 week). Exercise training was conducted in a 120 x 60 x 50 cm swimming pool with 10 x 15 x 50 cm lanes and with temperature controlled at  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### *Euthanasia*

Mice were anesthetized with an intraperitoneal (i.p) injection of ketamine chlorohydrate (50 mg/kg; Ketalar; Parke-Davis, Ann Arbor, MI) and xylazine (20 mg/kg; Rompun; Bayer, Leverkusen), and adipose, hepatic, and muscle tissue was extracted. In all experiments, the appropriateness of anesthesia depth was tested by evaluating pedal and corneal reflexes, throughout the experimental procedure. Following the experimental procedures, the mice were killed under anesthesia (thiopental 200 mg/kg), following the recommendations of the NIH publication.

### *Protein analysis by immunoblotting*

As soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavity was opened, the cava vein was exposed, and 0.2 mL of normal saline (-) or insulin ((+)  $10^{-6}$  M) were injected (6 mice per group). After insulin injection (only for insulin pathway analysis), adipose, liver, and muscle fragments were excised. The tissues were homogenized immediately in 1.0 mL of extraction buffer (1% Triton-X 100, 100 mM Tris, pH 7.4, containing 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF, and 0.1 mg of aprotinin/ml) at  $4^\circ\text{C}$  with a Polytron MR 2100 (Kinematica, Switzerland). The extracts were centrifuged at 11000 rpm and  $4^\circ\text{C}$  in an eppendorf centrifuge 5804R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 40 min to remove insoluble material, and the supernatants of this tissue were used for protein quantification, according to the Bradford method. Proteins were denaturated by boiling in Laemmli sample buffer containing 100 mM DTT. Next, 0.2 mg of protein extracts obtained from each sample were separated by SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked, probed, and developed. Antibodies used for immunoblotting were anti-IR, anti-phospho IR,

anti-IRS1 and anti-phospho IRS1 antibodies (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), and anti-Akt, anti-phospho Akt<sup>ser473</sup>, anti-APPL1, ADIPOR1 and 2 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Chemiluminescent detection was performed with horseradish peroxidase-conjugate secondary antibodies (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Autoradiographs of membranes were taken for the visualization of protein bands. The results of blots are presented as direct comparisons of the area of the apparent bands in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software (Scion Image software, ScionCorp, Frederick, MD).

### *Statistical analysis*

All numeric results are expressed as the means  $\pm$  standard error of mean (SEM) of densitometric units. The results of blots are presented as direct comparisons of bands or spots in autoradiographs and quantified by optical densitometry. Statistical analysis was performed using the ANOVA test with the Tukey post test. Significance level was established as  $p < 0.05$ . Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 18.0 for Windows.

## **Results**

### *Physiological and metabolic parameter*

The results show that DIO and DIO-T mice exhibited a significant weight gain when compared with control groups (Table 2). The DIO group presented a weight increased of 14.86 g; whereas the DIO-T group increased by 6.45 g, demonstrating that simultaneous exercise training reduces body weight gain.

### *Exercise training concomitant to high-fat diet feeding reduces degree of insulin resistance and improves adipor1/APPL1 protein levels in the adipose tissue*

The effects of exercise training on levels of phosphorylation of IR, IRS1, and Akt were examined in the adipose tissue of C, C-T, DIO, and DIO-T groups submitted to the exercise training. As expected, an insulin (+) injection showed increased IR, IRS, and Akt phosphorylation (Fig. 1a, 1b, and 1c, respectively) in the adipose tissue of mice that were fed chow standard (sedentary and training groups) when compared with those that were administered a saline (-) injection. However, when mice were fed with a high-fat diet and not submitted to training protocol (DIO group), IR, IRS, and Akt phosphorylation (Fig. 1a, 1b, and 1c, respectively) in adipose tissue were reduced, when compared with

control group. On the other hand, IR, IRS, and Akt phosphorylation (Fig. 1a, b, and c, respectively) in the adipose tissue of the DIO+T group increased, when compared with the DIO sedentary group. In parallel, the adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) and its molecule adaptor APPL1 exhibit market levels reduced when compared with control sedentary and training groups (Fig. 1d and 1e, respectively). However, when exercise training was performed simultaneously to high-fat diet feeding, it was partially reverted (Fig. 1d and e, respectively).

*Exercise training concomitant to high-fat diet feeding reduces degree of insulin resistance and improves adipoR2/APPL1 protein levels in the hepatic tissue*

The effects of exercise training on levels of phosphorylation of IR, IRS1, and Akt were also examined in the hepatic tissue. The insulin (+) injection showed increased IR, IRS, and Akt phosphorylation (Fig. 2a, 2b, and 2c, respectively) in the hepatic tissue of mice that were fed chow standard (sedentary and training groups) when compared with those that were administered a saline (-) injection. However, when mice were fed a high-fat diet and were not submitted to training protocol (DIO group), IR, IRS, and Akt phosphorylation (Fig. 2a, b and c, respectively) in hepatic tissue reduced, when compared with the control group. On the other hand, IR, IRS, and Akt phosphorylation (Fig. 2a, 2b, and 2c, respectively) in liver of the DIO+T group increased, when compared with the DIO sedentary group. In parallel, ADIPOR2 and APPL1 exhibit a marked reduction in levels when compared with control sedentary and training groups (Fig. 2d and 2e, respectively). However, when exercise training was performed simultaneously to high-fat diet feeding, it was partially reverted (Fig. 2d and 2e, respectively).

*Exercise training concomitant to high-fat diet feeding reduces degree of insulin resistance and improves adipoR1/APPL1 protein levels in the skeletal muscle*

As adipose and hepatic tissue, the insulin (+) injection showed increased IR, IRS, and Akt phosphorylation (Fig. 3a, 3b and 3c, respectively) in the hepatic tissue of mice that were fed chow standard, when compared with those that were administered a saline (-) injection. However, when mice were fed with a high-fat diet and were not submitted to training protocol (DIO group), IR, IRS, and Akt phosphorylation (Fig. 3a, 3b, and 3c, respectively) in hepatic tissue reduced, when compared with control group. On the other hand, IR, IRS, and Akt phosphorylation (Fig. 3a, 3b, and 3c, respectively) in liver

of the DIO+T group increased, when compared with the DIO sedentary group. In parallel, ADIPOR2 and APPL1 exhibit market reduction in levels when compared with control sedentary and training groups (Fig. 3d and e, respectively). However, when exercise training was performed simultaneously to high-fat diet feeding, it was partially reverted (Fig. 3d and 3e, respectively).

## Discussion

The prevalence of obesity and associated chronic diseases has increased significantly in recent years worldwide. A high-fat diet and physical inactivity have been imputed as precursors of insulin resistance, mainly in adipose, hepatic, and muscle tissue [1-3]. On the other hand, physical exercise has been described as a way of controlling glucose homeostasis and increasing insulin sensitivity in several tissues. Over the past several years, considerable progress has been made in understanding the molecular basis for these clinically important effects of physical exercise. In fact, there is now extensive epidemiological evidence demonstrating that long-term regular physical exercise can significantly reduce the body fat and insulin resistance. The molecular mechanism involved in sensitivity to insulin mediated by physical exercise is associated to the increase in levels of phosphorylation in pivotal protein related to insulin signal transduction, such as IR, IRSs, and Akt [19-24]. However, most studies have evaluated the therapeutic effects of physical exercise in individuals who already have obesity; whereas a few studies have demonstrated the impact of this intervention when applied simultaneously (protective manner) to those fed a high-fat (that wisely induces both obesity and insulin resistance). In the present study, we showed that mice which were fed with a high-fat diet and not submitted simultaneously to exercise training protocol have reduced levels of phosphorylation of IR, IRS, and Akt in hepatic, muscle, and adipose tissue, when compared with the chow standard control group. As widely expected, a high-fat diet will induce insulin resistance. On the other hand, when mice were fed with a high-fat diet and were simultaneously submitted to exercise training, the degree of insulin resistance was significantly reduced; that is, the levels of phosphorylation of IR, IRS, and Akt increased in the DIO-T group when compared with the DIO group.

Several mechanisms have been shown to link obesity and insulin resistance. Obesity has been strongly associated with a pro-inflammatory molecule (low-grade inflammation), including the IKK/NF- $\kappa$ B pathway [27]. Increased activation of the IKK/NF- $\kappa$ B



pathway results in increased serine 307 phosphorylation of IRS-1 that, ultimately, leads to impaired insulin signaling in several peripheral tissue [28]. A previous study, including our group, showed that diet-induced obesity rats submitted to exercise training reduce activation of both the NF- $\kappa$ B and serine 307 phosphorylation of IRS-1, leading to a decreased resistance to insulin [27,29]. In addition, evidence demonstrates that exogenous nitric oxide (NO) and the NO produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS) can induce insulin resistance by S-nitrosation [30]. So, Pauli and colleagues investigated whether this insulin resistance, mediated by S-nitrosation of proteins involved in early steps of the insulin signal transduction pathway, could be reversed by physical exercise [31]. The authors observed that physical activity can revert insulin resistance through the reduction of S-nitrosation of the IR and IRS proteins. Other well-characterized molecules that induce insulin resistance and are induced by the high-fat diet are the phosphatase protein, such as PTP, PTEN, and SOCS3. These proteins have been reported to bind to the insulin receptor and prevent the coupling of IRS-1 with the insulin receptor, thereby inhibiting IRS-1 phosphorylation and downstream insulin signaling [32,33]. Our group also showed that 12 weeks of exercise training reduced the expression of both phosphatase and SOCS3 [29].

As described earlier, a gamma of results has shown that exercise training decreases molecules activity or protein levels that can lead to insulin resistance (PTEN, PTP1B, SOCS3, pro-inflammatory molecule, S-nitrosation, and others); it can also improve insulin resistance. In addition, insulin sensitivity may be improved by increased adiponectin levels [14]. Adiponectin is adipokine that is predominantly secreted by differentiated adipocytes that are involved in energy homeostasis, insulin sensitivity, and the anti-inflammatory response [34]. The physical exercise leads to higher levels of adiponectin, and it may also reduce insulin resistance [for review see 35]. Adiponectin is reduced in obesity and increased levels of this peptide by exercise training may improve insulin signal transduction [25]. Co-treatment of C2C12 myotubes with adiponectin and insulin showed a synergistic increase in Akt phosphorylation, and this synergism disappeared in APPL1 knockdown cells [14]. Hence, the involvement of adiponectin in this process is demonstrated. Here, we showed that mice which were fed with a high-fat diet and not submitted simultaneously to exercise training protocol (DIO group) have reduced adiponectin receptor R1 and 2 and APPL1 protein levels in hepatic, muscle, and adipose tissue, when compared with the chow standard control group. On the other hand,

when mice were fed with a high-fat diet and simultaneously submitted to exercise training, the degree of reduction of ADIPOR1-2 and APPL1 was significantly smaller; that is, ADIPOR1-2 and APPL1 protein levels increased in the DIO-T group when compared with the DIO group.

Adiponectin exerts its action through its receptors ADIPOR1 and ADIPOR2. ADIPOR1 and ADIPOR2 interact with the adaptor protein that contains a pleckstrin homology domain, a phosphotyrosine domain, and a leucine zipper motif (APPL1), which bind the N-terminal intracellular domains of the receptors [10-13]. It has been demonstrated that the endosomal adaptor protein, APPL1, regulates the activity of Akt [14]. The improvement found that insulin signaling in different tissues studied in the present study, least in part, can be attributed to recovery protein levels in adiponectin receptors and APPL1. Previous studies have demonstrated that exercise training induces increased adiponectin levels [35,36], and ADIPOR1 protein levels in skeletal muscle [37]. In parallel, Marinho et al [25] have found that exercise increases insulin action, at least in part, through the enhancement of APPL1 expression in the liver of obese mice. Our results confirm that an improvement in insulin action can be, least in part, via adipoR1-2/APPL1. Taken together, our data demonstrated that exercise training performed concomitantly to feeding with a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adiponectin receptors 1 and 2 and APPL1 protein levels in the hepatic, adipose, and skeletal muscle tissue.

### **Acknowledgements**

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development [CNPq/MCT, Brazil], the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education [CAPES/MEC, Brazil], and the Research Foundation of the State of Santa Catarina [FAPESC, Brazil, FUMDES-SC and Universidade do Extremo Sul Catarinense [UNESC, Brazil].

### **Author's contributions**

J.M.F., R.M.M., C.T.S, and R.A.P. designed research; K.F.B, L.A.S., T.F.L., and S.O.M. conducted research; J.M.F., F.S.L., C.T.S., and R.A.P. analyzed data; J.M.F., F.S.L., C.T.S., and R.A.P. wrote the article. All authors read and approved the final manuscript.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Manu P, Tsang J, Napolitano BA, [Lesser ML](#), [Correll CU](#): **Predictors of insulin resistance in the obese with metabolic syndrome.** *Eur J Int Med* 2010, **21**:409-13.
2. Stein CJ, Colditz GA: **The epidemic of obesity.** *J Clin Metabol* 2004, **89**:2522-2525.
3. Spiegelman BM, Flier JS: **Obesity and the regulation of energy balance.** *Cell* 2001, **104**:531-543.
4. Cheathan B, Kahn CR: **Insulin action and the insulin signaling network.** *Endocr Res* 1995, **16**: 17-42.
5. Folli F, Saad MJ, Backer JM, [Kahn CR](#): **Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-Kinase activity and association with receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat.** *J Biol Chem* 1992, **267**:22171-22177.
6. Folli F, Saad MJ, Backer JM, [Kahn CR](#): **Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus.** *J Clin Invest* 1193, **92**:1787-1794.
7. White MF, Kahn CR: **The insulin signaling system.** *J Biol Chem* 1994, **269**:1-4.
8. Downward J: **Mechanism and consequences of PKB/ Akt activation.** *Curr Opin Cell Biol* 1998, **10**:262-267.
9. Chen YA, Scales SJ, Duvvuri V, [Murthy M](#), [Patel SM](#), [Schulman H](#), [Scheller RH](#): **Calcium regulation of exocytosis PC12 cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**:2662-87.
10. Kadowaki T, Yamauchi T: **Adiponectin and adiponectin receptors.** *Endocr Rev* 2005, **26**:439-451.
11. Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE: **Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue.** *J Clin Invest* 2007, **117**: 2621-2637.
12. Ouchi N, Kihara S, Arita Y: **Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin.** *Circulation* 1999, **100**: 2473-2476.
13. Deepa SS, Dong LQ: [PPL1: role in adiponectin signaling and beyond.](#) *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, **296**:22-36.
14. Mao X, Kikani CK, Riojas RA, Langlais P, Wang L, Ramos FJ, Fang Q, Christ-Roberts CY, Hong JY, Kim RY, Liu F, Dong LQ: **APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates**

- adiponectin signalling and function.** *Nat Cell Biol* 2006, **8**:516-523.
15. Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, [Wells GA](#), [Sigal RJ](#): **Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials.** *Jama* 2001, **12286**:1218-1227.
  16. Boulé NG, Kenny GP, Haddad E, [Wells GA](#), [Sigal RJ](#): **Meta analysis of the effect of structured exercise training on cardiorespiratory fitness in type 2 diabetes mellitus.** *Diabetologia* 2003, **46**:1071-1081.
  17. Goodyear LJ, Kahn BB: **Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity.** *Annu Rev Med* 1998, **49**:235-261.
  18. Hardman AE: **Exercise in the prevention of atherosclerotic, metabolic and hypertensive diseases: a review.** *J Sports Sci* 1996, **14**:201-218.
  19. Lima AF, Ropelle ER, Pauli JR, [Cintra DE](#), [Frederico MJ](#), [Pinho RA](#), [Velloso LA](#), [De Souza CT](#): **Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice.** *J Cell Physiol* 2009, **221**:92-97.
  20. Tanaka S, [Hayashi T](#), [Toyoda T](#), [Hamada T](#), [Shimizu Y](#), [Hirata M](#), [Ebihara K](#), [Masuzaki H](#), [Hosoda K](#), [Fushiki T](#), [Nakao K](#): **High-fat diet impairs the effects of a single bout of endurance exercise on glucose transport and insulin sensitivity in rat skeletal muscle.** *Metabolism* 2007, **56**:1719-1728.
  21. Chibalin AV, Yu M, Ryder JW, [Song XM](#), [Galuska D](#), [Krook A](#), [Wallberg-Henriksson H](#), [Zierath JR](#): **Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:38-43.
  22. Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, [de Souza CT](#), [Picardi PK](#), [Faria MC](#), [Cintra DE](#), [Fernandes MF](#), [Flores MB](#), [Velloso LA](#), [Saad MJ](#), [Carvalho JB](#): **Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation.** *J Physiol* 2006, **15577**:997-1007.
  23. Da Luz G, Frederico MJ, da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, de Pinho RA, Pauli JR, Silva AS, Cintra DE, Ropelle ER, De Souza CT. **Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats.** *Eur J Appl Physiol* 2011, **111**:2015-23.

24. Medeiros C, Frederico MJ, da Luz G, Pauli JR, Silva AS, Pinho RA, Velloso LA, Ropelle ER, De Souza CT. [Exercise training reduces insulin resistance and upregulates the mTOR/p70S6k pathway in cardiac muscle of diet-induced obesity rats.](#) *J Cell Physiol* 2011, **226**(3):666-74.
25. Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, Colantonio E, D'Almeida V, Pauli JR. **Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss.** *J Cell Physiol* 2012, **227**:2917-26.
26. De Souza CT, Araújo EP, Prada PO, Saad MJ, Boschero, Velloso LA. **Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice.** *Diabetologia* 2005, **48**:1860-71.
27. Sriwijitkamol A, Christ-Roberts C, Berria R, Eagan P, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Musi N. **Reduced skeletal muscle inhibitor of kappaBbeta content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training.** *Diabetes* 2006, **55**:760–767.
28. Tanti JF, Jager J. [Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates \(IRS\) serine phosphorylation.](#) *Curr Opin Pharmacol* 2009, **9**:753-62.
29. Medeiros C, Frederico MJ, da Luz G, Pauli JR, Silva AS, Pinho RA, Velloso LA, Ropelle ER, De Souza CT. [Exercise training reduces insulin resistance and upregulates the mTOR/p70S6k pathway in cardiac muscle of diet-induced obesity rats.](#) *J Cell Physiol* 2011, **226**:666-74.
30. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, Velloso LA, Curi R, Saad MJ. [S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance.](#) *Diabetes* 2005, **54**:959-67.
31. Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB, Saad MJ. [Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor.](#)

- [insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats.](#) *J Physiol* 2008, **586**:659-71.
32. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. **SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2.** *J Biol Chem* 2002, **277**:42394-42398.
  33. Maehama T, Dixon JE. [The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate.](#) *J Biol Chem* 1998, **22**:13375-13378.
  34. Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Seelaender M, Damaso AR, Oyama LM, do Nascimento CO. **Both adiponectin and interleukin-10 inhibit LPS-induced activation of the NF- $\kappa$ B pathway in 3T3-L1 adipocytes.** *Cytokine* 2012, **57**:98-106.
  35. Simpson [KA](#), Singh [MA](#). **Effects of exercise on adiponectin: a systematic review.** *Obesity (Silver Spring)* 2008, **16**:241-56.
  36. Schenck A, Goto-Silva L, Collinet C, Rhinn M, Giner A, Habermann B, Brand M, Zerial M. **The endosomal protein Appl1 mediates Akt substrate specificity and cell survival in vertebrate development.** *Cell* 2008, **133**:486-497.
  37. Chang SP, Chen YH, Chang WC, Liu IM, Cheng JT. **Increase of adiponectin receptor gene expression by physical exercise in soleus muscle of obese Zucker rats.** *Eur J Appl Physiol* 2006, **97**:189-95.

## Legends

**Table 1:** Components of high-fat diet and standard diet.

**Table 2:** Body weight of mice fed with high-fat or chow standard diet and submitted simultaneously to exercise training. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , different of C-T versus C groups, # $p < 0.05$  different of DIO versus control groups, and \$ $p < 0.05$  different of DIO-T versus DIO groups.

**Figure 1:** *Effects of exercise training concomitant to high-fat diet feeding on IR, IRS1, and Akt phosphorylation and adipor1/APPL1 protein levels in the adipose tissue*

Analysis of insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR (**A**), IRS1 (**B**), phosphorylation of Akt<sup>Ser473</sup> (**C**) and ADIPOR1 (D) and APPL1 (E) protein levels. In lower panels, original membrane stripped and reblotted for IR, IRS1, and Akt total protein levels (**A**, **B** and **C**, respectively) and

□-actin (**D** and **E**). The results are presented as means  $\pm$  SEM of  $n = 6$ , \* $p < 0.05$ , different from C-T and C groups with insulin injection versus C-T and C groups with saline injection, # $p < 0.05$  different from DIO versus control groups, and \$ $p < 0.05$  different from DIO-T versus DIO groups.

**Figure 2:** *Effects of exercise training concomitant to high-fat diet feeding on IR, IRS1, and Akt phosphorylation and adipor2/APPL1 protein levels in the hepatic tissue*

Analysis of insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR (**A**), IRS1 (**B**), phosphorylation of Akt<sup>Ser473</sup> (**C**) and ADIPOR2 (**D**) and APPL1 (**E**) protein levels. In lower panels, original membrane stripped and reblotted for IR, IRS1, and Akt total protein levels (**A**, **B** and **C**, respectively) and □-actin (**D** and **E**). The results are presented as means  $\pm$  SEM of  $n = 6$ , \* $p < 0.05$ , \* $p < 0.05$ , different from C-T and C groups with insulin injection versus C-T and C groups with saline injection, # $p < 0.05$  different from DIO versus control groups, and \$ $p < 0.05$  different from DIO-T versus DIO groups.

**Figure 3:** *Effects of exercise training concomitant to high-fat diet feeding on IR, IRS1, and Akt phosphorylation and adipor2/APPL1 protein levels in the skeletal muscle*

Analysis of insulin-induced tyrosine phosphorylation of IR (**A**), IRS1 (**B**), phosphorylation of Akt<sup>Ser473</sup> (**C**) and ADIPOR2 (**D**) and APPL1 (**E**) protein levels. In lower panels, original membrane stripped and reblotted for IR, IRS1, and Akt total protein levels (**A**, **B**, and **C**, respectively) and □-actin (**D** and **E**). The results are presented as means  $\pm$  SEM of  $n = 6$ , \* $p < 0.05$ , \* $p < 0.05$ , different from C-T and C groups with insulin injection versus C-T and C groups with saline injection, # $p < 0.05$  different from DIO versus control groups, and \$ $p < 0.05$  different from DIO-T versus DIO groups.

## Anexos

**Table 1.** Components of high fat and chow diet.

Ingredients	Standard diet		High-fat diet	
	g.kg <sup>-1</sup>	kcal.kg <sup>-1</sup>	g.kg <sup>-1</sup>	kcal.kg <sup>-1</sup>
Cornstarch	398	1590	116	462
Casein	200	800	200	800
Sucrose	100	400	100	400
Dextrinated starch	132	528	132	528
Lard	-	-	312	2808
Soybean Oil	70	630	40	360
Cellulose	50	-	50	-
Mineral mix	35	-	35	-
Vitamin mix	10	-	10	-
L-Cystine	3	-	3	-
Choline	2.5	-	2.5	-
Total	1000	3948	1000	5358

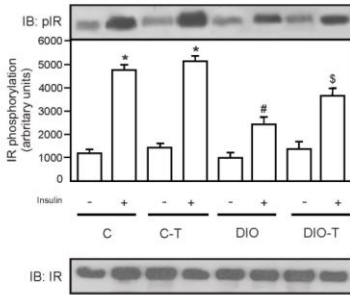
**Table 2:** Body weight and training control

Groups	Body weight (mg) Mean±EPM	Blood lactate (nmol/L) Mean±EPM			
		Basal	1 <sup>th</sup> session	20 <sup>th</sup> session	Last session
<b>SD</b>	40.43±1.08	2.13±0.19	-	-	-
<b>HFD</b>	55.29±2.00*		-	-	-
<b>SD+Ex</b>	37.14±0.90		3.92±0.13*	4.27±0.25*	4.13±0.27*
<b>HFD+Ex</b>	46.88±1.83* <sup>\$</sup>		4.10±0.10*	4.60±0.20*	4.48±0.28*

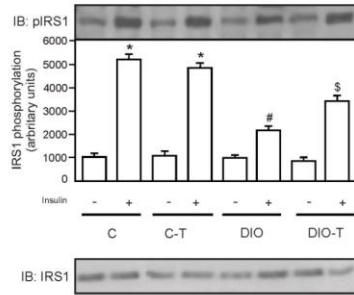


Figure 1

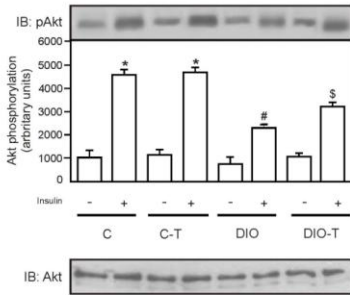
a



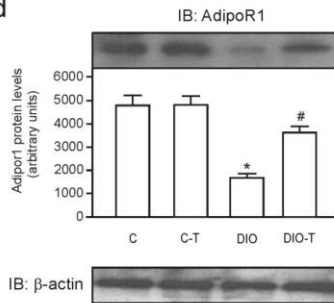
b



c



d



e

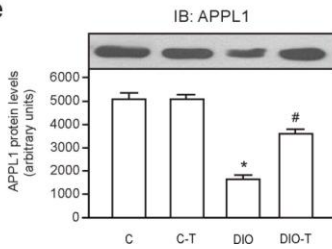
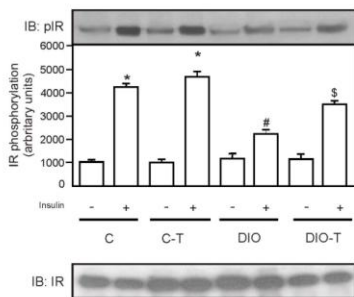
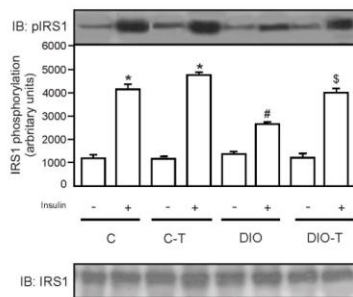


Figure 2

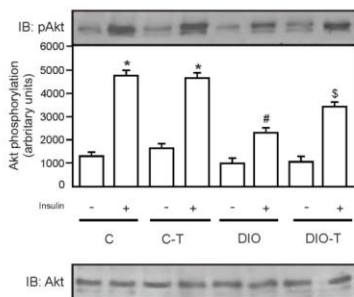
a



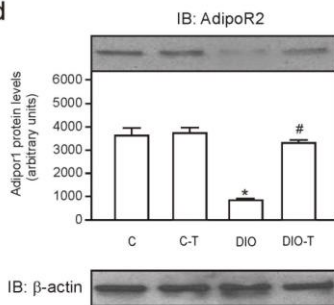
b



c



d



e

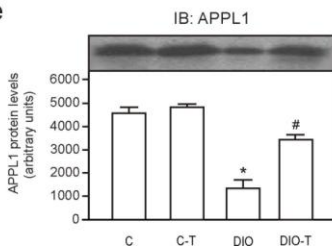
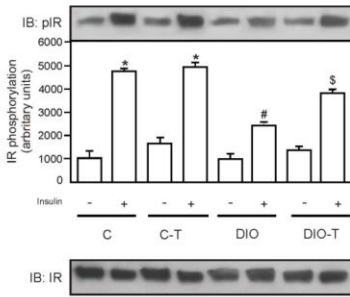
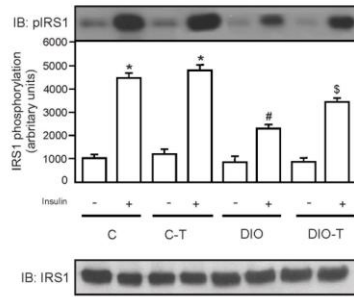


FIGURE 3

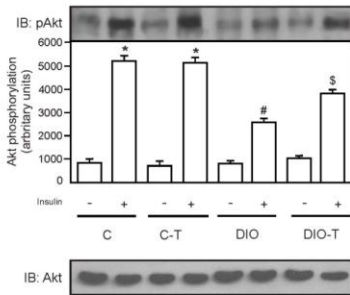
a



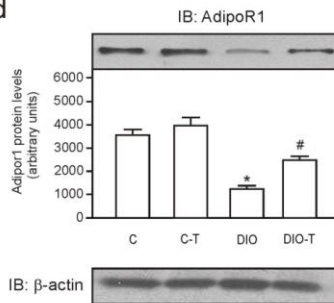
b



c



d



e

