

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

PAULINE SOUZA EFFTING

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE A RESISTÊNCIA À
INSULINA, PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

**CRICIÚMA
JANEIRO 2019**

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

PAULINE SOUZA EFFTING

**EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE A RESISTÊNCIA À
INSULINA, PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM
CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre P. Müller
Coorientador: Prof. Dr. Rolando B. Ceddia

**CRICIÚMA
JANEIRO 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

E27e Effting, Pauline Souza.

Efeitos do treinamento resistido sobre a resistência à insulina, parâmetros de estresse oxidativos e inflamatórios no músculo esquelético em camundongos com obesidade induzida por dieta / Pauline Souza Effting. - 2019.

122 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Alexandre P. Müller.

Coorientação: Rolando B. Ceddia.

1. Obesidade. 2. Resistência à insulina. 3. Exercício resistido. 4. Músculo esquelético. 5. Estresse oxidativo. 6. Inflamação. I. Título.

CDD 23. ed. 616.398



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

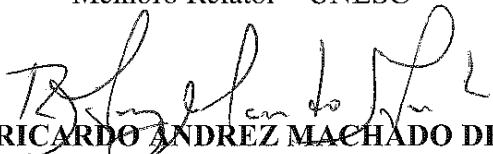
PARECER

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 pela candidata **Pauline Souza Effting** sob o título “EFEITOS DO TREINAMENTO RESISTIDO SOBRE A RESISTÊNCIA À INSULINA, PARÂMETROS DE ESTRESSE E INFLAMATÓRIOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA”, para obtenção do grau de DOUTORA 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 arguido a candidata, os membros são de parecer pela “APROVAÇÃO” da Tese.


Criciúma, SC, 28 de fevereiro de 2019.

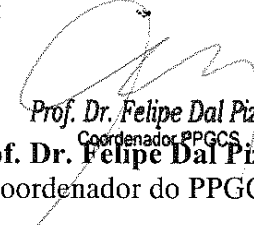

Profa. Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE
Membro Relator – UNESC


Prof. Dr. RICARDO ANDRÉZ MACHADO DE ÁVILA
Membro Interno – UNESC


Prof. Dr. ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS
Membro Externo – UFSC


Prof. Dr. ADERBAL SILVA AGUIAR JÚNIOR
Membro Externo – UFSC


Prof. Dr. Alexandre Pastoris Müller
Orientador


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional, de acordo com a resolução nº01/2015/colegiado de coordenação PPGCS. Os primeiros três anos deste trabalho foram realizados nas antigas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (LAFIBE), sob orientação do professor Dr. Ricardo Aurino de Pinho, e finalizado nas novas instalações do Laboratório de Biomedicina Translacional, sob a orientação do professor Dr. Alexandre P. Müller. Ambos os laboratórios pertencentes ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma-SC, Brasil. Parte das análises de PCR foram realizadas em parceria com o Laboratório de Biologia Genômica e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brasil, sob supervisão do professor Dr. Maurício Bogo. As análises de dano em DNA foram realizadas nas antigas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – LABIM, hoje Laboratório de Biomedicina Translacional Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma-SC, sob supervisão da professora Dra. Vanessa Moraes de Andrade. Já as imagens das análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Exercício em Saúde (BioEx), da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob supervisão do professor Dr. Ricardo A. Pinho, e analisadas pela Dra. Renata T. Nesi. O treinamento de algumas técnicas laboratoriais, e alguns resultados apresentados na discussão desta tese, foram realizados durante o período sanduíche deste doutorado sob a orientação do professor Dr. Rolando B. Ceddia no Muscle Health Research Center, School of Kinesiology and Health Science na York University, Toronto-ON, Canadá.

Dedico este trabalho às três pessoas que me deram apoio incondicional e tornaram esta conquista possível. Meu marido Rodrigo Becker Stange, minha mãe Maria Rosinete Souza Effting, e meu pai Bernardo Effting.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo minha família. Foi o apoio por dado por eles que tornaram esta conquista ser possível. Meus pais, Bernardo e Rosi, que me deram o suporte financeiro e o apoio incondicional para realização deste doutorado. Agradeço também a meus três irmãos, Guinther, Bernardo e Rafael, que entenderam minha ausência ao longo desse processo. Em especial, eu agradeço meu marido, Rodrigo. Este foi de extrema importância durante todas as etapas, mas principalmente durante o período sanduíche no Canadá. Ele aceitou deixar de lado tudo na sua vida e me acompanhar em quase um ano de estudos em outro país, sem ao menos conhecer o inglês. Sua presença lá fez com que a solidão e a distância de casa fossem suportáveis, como também me deu suporte para que eu conseguisse dar foco nos estudos e nos experimentos do laboratório, sem me preocupar com mais nada. Também agradeço seu apoio em todos os momentos que me ausentei de casa e de seu convívio para passar horas extras, finais de semana e feriados no laboratório ou em frente ao computador.

Ainda sobre o período sanduíche do meu doutorado, agradeço a oportunidade deste ao meu orientador à época, professor Dr. Ricardo A. Pinho, que me ofereceu a bolsa, e ao professor Dr. Rolando B. Ceddia, que me aceitou em seu laboratório na York University. Durante este período tive uma experiência única sobre fazer ciência em outro país, como também foi a primeira vez que fui bolsista e pude me dedicar exclusivamente ao laboratório. Um dos meus maiores agradecimentos deste doutorado é para minha *former labmate*, e hoje querida amiga, mesmo que à distância, Diane M. Sepa-Kishi. Ela que me ensinou muito do que sei sobre trabalhos de bancada. Devido à sua dedicação em ensinar, juntamente com professor Ceddia, voltei para o Brasil e para meu laboratório com conhecimentos que me tornaram referência em várias técnicas. "*Lab 225A - Happiness is a successful Western – Ceddia proverb*".

Ao professor Dr. Ricardo A. Pinho, chega a ser difícil colocar em palavras a imensa gratidão que sinto por todos esses anos de trabalho, e por tudo que aprendi com ele. Não foram somente ensinamentos técnicos. O que aprendi com esse professor amigo foram ensinamentos que vou levar para a vida. Comecei a trabalhar com ele em 2009, em meu mestrado, e até hoje, mesmo que intercorrências indesejadas nos tenham colocada em laboratórios diferentes, ele ainda me auxilia em

qualquer questão necessária para este trabalho. Quero te agradecer Ricardo pois teus ensinamentos ajudaram a me tornar a pesquisadora que sou hoje, e sei que estou muito bem preparada para o mercado de trabalho, independente da área de atuação. Agradeço também à tua família: tua esposa Alessandra, ao Vini e ao Rafa, que sempre me receberam e me trataram com muito carinho. Serei eternamente grata a você e espero que nossa amizade perdure além de qualquer trabalho.

Agradeço ao LAFIBE – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício. Minha casa por muitos anos. Foram tantas histórias, tantas pessoas, que fica impossível citar nomes aqui. Por isso agradeço a todos que fizeram parte da minha história neste laboratório que ficará eternamente em nossa memória e em nosso coração.

Agradeço também ao professor Dr. Alexandre P. Müller. Obrigada por aceitar minha orientação e o meu trabalho, já praticamente pronto, no último ano. Foi um momento muito difícil, de muitas mudanças, muitos problemas, muitos desencontros. Agradeço imensamente por tua paciência e tua compreensão nos momentos que passei por essas dificuldades, e por teu esforço pessoal em querer ajudar em um trabalho que você teve que assumir de última hora.

Com isso, também agradeço a todos do Laboratório de Biomedicina Translacional: tanto aos alunos do grupo do professor Alexandre, como à professora Dra. Vanessa Moraes de Andrade e seus alunos. Não vou aqui citar nomes porque cada pessoa que convivi neste último ano, neste laboratório, ajudou de certa forma neste trabalho, ou no convívio do dia a dia.

Outra pessoa que merece um agradecimento especial é a Dra. Renata T. Nesi, ou simplesmente a Rê. Por esta tese ser parte de um grande projeto do LAFIBE, a Renata, na condição de post-doc, fez parte da coordenação da parte experimental de indução da obesidade, treinamento, eutanásia e primeiras análises de bancada. E no final, foi de suma importância nas análises histológicas dos resultados desta tese. Fora todos os telefonemas, choros, Skypes, jantãs e vinhos para reclamar do doutorado, ou do cansaço, ou de algo que nunca funcionava, ou em períodos onde me sentia uma fraude científica. Obrigada pela cooperação no trabalho, e por tua amizade.

Agradeço também algumas amigas que este doutorado me trouxe: Bárbara, Helen, Adri e Marina. A Bárbara e a Helen já são amigas de LAFIBE, e a Adri e a Marina foram gurias que passei a conviver mais este ano. Vocês foram de extrema

importância. Obrigada pelas risadas, pelas conversas, e pelo ombro amigo nas horas de cansaço e desalento. Consigo escutar até hoje as palavras “calma, vai dar tudo certo” na voz da Adri e da Marina, a Bárbara me acompanhando nas revoltas, e a Helen me acompanhando nos desesperos. Muito obrigada gurias.

Em relações a outras cooperações técnicas, faço um agradecimento especial ao professor Dr. Maurício Bogo e às colegas Dra. Talita Pereira e Dra. Luiza Kirst, pós-doutorandas do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUC-RS pela cooperação e análises de PCR de última hora, e à professora Vanessa Moraes de Andrade e sua alunas pelas avaliações de dano em DNA.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do Programa Ciências Sem Fronteiras na modalidade Pesquisador Visitante Especial, pela bolsa sanduíche e pelo apoio financeiro deste trabalho.

Por fim agradeço a todos que fizeram parte deste trabalho, e à Deus, pelo dom da vida, da sabedoria, da resiliência e da gratidão.

“A corpulência não é apenas uma enfermidade em si, mas o prenúncio de outras. A morte súbita é mais comum naqueles que são naturalmente gordos do que nos magros”

Hipócrates (460 a.C.-370 a.C.)

RESUMO

A obesidade é um dos problemas de saúde pública mais emergentes da atualidade. É uma condição complexa, com sérias dimensões sociais e psicológicas que afeta praticamente todos os grupos etários e socioeconômicos. São emergentes os estudos demonstrando o papel do exercício aeróbico na obesidade e nas suas comorbidades. Em contraste, poucas informações estão disponíveis em torno do exercício físico resistido, e em particular, que detalhem com clareza os efeitos bioquímicos e moleculares no músculo esquelético. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do treinamento resistido, associado ao consumo de dieta hiperlipídica, sobre a resistência à insulina, parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios no músculo esquelético em camundongos com obesidade induzida por dieta. Vinte e dois camundongos Swiss machos foram inicialmente divididos em grupo DP (dieta padrão) e DIO (obesidade induzida por dieta) e alimentados por 17 semanas. A dieta hiperlipídica possuía 59% das calorias provenientes de lipídeos (5,3kcal/g). Após verificada a instalação do quadro de obesidade associado à resistência à insulina no grupo DIO, os animais dos prévios grupos DP e DIO foram novamente randomizados em treino resistido (R) e não treinado (N): DP-N (n=4), DP+R (n=6), DIO-N (n=6) e DIO+R (n=6). O treinamento resistido foi realizado concomitante ao protocolo de indução de obesidade, em aparato de escalada, durante oito semanas, com incremento de carga (20-75% do peso corporal acoplado à cauda do animal) e volume (início: 5 séries de 5 repetições; final: 10 séries de 5 repetições). Os resultados demonstraram que a composição da dieta hiperlipídica ofertada aos animais deste estudo foi eficaz em instalar o quadro de obesidade (aumento de peso de 47% entre o início e o final do estudo, grupo DIO) associado à resistência à insulina (prejuízo significativo na taxa de decaimento da glicose – $p < 0,01$ – quando comparado ao DP de mesma idade). O exercício resistido foi eficaz no controle do ganho de peso e no acúmulo de gordura dos animais obesos treinados. Foi também eficaz em diminuir a hipertrofia do adipócito ($p < 0,01$) no tecido adiposo branco. Sua eficácia também foi presente na melhora do quadro de resistência à insulina, com melhora do quadro de hiperglicemia de jejum ($p < 0,001$), da taxa de decaimento da glicose (kTTI – $p < 0,05$), aumento da fosforilação da Akt Ser⁴⁷³ ($p < 0,05$) e da AMPK Thr¹⁷² ($p < 0,001$) no músculo esquelético quando comparado ao grupo DIO. Neste tecido, o exercício também foi capaz de equilibrar o balanço redox, restabelecendo a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Também reverteu o aumento de TNF- α e IL1 β quando comparado aos animais obesos não treinados. Desta forma, o exercício resistido, além dos benefícios já conhecidos, pode ser um grande aliado no processo de saúde relacionado à abordagem terapêutica da obesidade, principalmente na melhora da sensibilidade à insulina e da captação da glicose, processos relacionados à resistência à insulina, uma das principais comorbidades vinculando a obesidade e a DMT2.

Palavras-chave: Obesidade; Resistência à Insulina; Exercício Resistido; Músculo Esquelético; Estresse Oxidativo; Inflamação.

ABSTRACT

Obesity is one of the most emerging public health problems of nowadays. It is a complex condition, with serious social and psychological dimensions that affects practically all the socioeconomic and age groups. Studies showing the role of aerobic exercise in obesity and in its comorbidities are emerging. In contrast, little information is available around resistance exercise, and in particular, details about the biochemical and molecular effects on skeletal muscle. The aim of this study was to assess the effects of resistance training, associated to the consumption of high fat diet, on insulin resistance, oxidative stress and inflammatory parameters in skeletal muscle in mice with diet-induced obesity. Twenty-two male Swiss mice were initially divided into SD (dietary standard diet) and DIO (diet-induced obesity) groups and fed for 17 weeks. The high-fat diet had 59% of the calories from lipids (5.3kcal/g). After the onset of obesity associated with insulin resistance in the DIO group, the animals of the previous groups SD and DIO were again randomized in resistance training (R) and untrained (N): SD-N (n=4), SD+R (n=6), DIO-N (n=6) e DIO+R (n=6). Resistance training was performed concomitantly with high-fat diet, in a climbing apparatus for eight weeks, with an increase in load (20-75% of the body weight coupled to the tail of the animal) and volume (initial protocol: 5 sets of 5 repetitions; final protocol: 10 series of 5 repetitions). Diet-induced obesity with high-fat diet was effective in establishing obesity (weight gain of 47% between the beginning and the end of the study, DIO group) associated with insulin resistance (significant impairment in glucose decay rate - $p < 0.01$ - when compared to SD same age group). Resistance exercise was effective in controlling weight gain and fat accumulation in trained obese animals. It was also effective in decreasing adipocyte hypertrophy ($p < 0.01$) in white adipose tissue. Resistance exercise was also effective in improving insulin resistance, with improvement in fasting hyperglycemia ($p < 0.001$), glucose decay rate (kITT - $p < 0.05$), increased phosphorylation of Akt Ser⁴⁷³ ($p < 0.05$) and AMPK Thr¹⁷² ($p < 0.001$) in skeletal muscle, when compared to DIO group. In the same tissue, exercise was also able to balance the redox environment, restoring the activity of antioxidant superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes. Exercise also reverts the increased TNF- α and IL1 β levels, when compared to obese sedentary animals. Thus, resistance exercise, in addition to the benefits already known, can be a great ally in the health process related to the therapeutic approach of obesity, mainly in the improvement of insulin sensitivity and glucose uptake, processes related to insulin resistance, of the main comorbidities linking obesity and T2DM.

Key-words: Obesity; Insulin Resistance; Resistance Exercise; Skeletal Muscle; Oxidative stress; Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Bifurcação da sinalização da insulina (INS) levando a translocação do GLUT4.....	27
Figura 2: Cascata de sinalização da insulina no tecido muscular esquelético	29
Figura 3: Via da sinalização na captação de glicose e a influência de citocinas, ácidos graxos livres (AGL) e lipopolissacarídeos (LPS) no processo de resistência à insulina.....	30
Figura 4: Linha do tempo - desenho experimental do estudo	40
Figura 5: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica no peso corporal total.....	53
Figura 6: Efeitos do protocolo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica na resistência à insulina.....	54
Figura 7: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica no perfil do tecido adiposo branco.....	56
Figura 8: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica no perfil histológico do tecido adiposo branco.....	58
Figura 9: Efeitos do protocolo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DIO) no perfil histológico do tecido muscular esquelético.....	59
Figura 10: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica na glicemia de jejum e no teste de tolerância à insulina (TTI).....	61
Figura 11: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica na via de sinalização da insulina no tecido muscular esquelético.....	64
Figura 12: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica na expressão gênica (mRNA) de moléculas envolvidas na captação de glicose no tecido muscular esquelético.....	65
Figura 13: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica sobre marcadores inflamatórios no tecido muscular esquelético.....	66
Figura 14: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica sobre a expressão gênica (mRNA) de moléculas da via das MAPK's no tecido muscular esquelético.....	67

Figura 15: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica sobre parâmetros de estresse oxidativo do tecido muscular esquelético.....	69
Figura 16: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica sobre a expressão gênica (mRNA) de subunidades da proteína NADPH oxidase.....	70
Figura Suplementar 1: Efeitos da exposição ao palmitato na captação de glicose estimulada por insulina e na sinalização molecular da insulina em células musculares L6.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação internacional de obesidade segundo o Índice de Massa Corporal (IMC) e riscos de doenças.....	21
Tabela 2: Prevalência de sobrepeso e obesidade entre adultos (+18 anos) no Brasil.....	22
Tabela 3: Protocolo de Treinamento Resistido.....	42
Tabela 4: Desenho Primers – Real Time PCR	46
Tabela 5: Valores de glicose (mg/dL) referentes ao Teste de Tolerância à Insulina (TTI)	62

LISTA DE ABREVIações

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica

AGL – Ácidos Graxos Livres

Akt/PKB – Proteína Quinase B

AMPK – Proteína Quinase Ativada por 5' Adenosina Monofosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – Serum de albumina bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

CaMKK – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (do inglês *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase*)

CAT – Catalase

CCL2 - Quimiocina (motivo C-C) 2 (do inglês *Chemokine (C-C motif) ligand 2*)

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês *Complementary Desoxy-ribonucleic acid*)

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPT1 – Carnitina Palmitoil-transferase 1

Cys-SeH – Selenocisteína

Cys-SeOH – Ácido Cisteínico Selenênico

DAG – Diacilglicerol

DCFH – 2',7'- Diclorodihidrofluorescína

DCFH-DA - 2',7'- diclorodihidrofluoresceína acetato

DIO – Obesidade Induzida por Dieta (do inglês *Diet-induced Obesity*)

DIO+R – Obesidade Induzida por Dieta + Treino Resistido

DMT2 – Diabetes Melitus Tipo 2

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

DNTP - 2,4-dinitrofenilhidrazina

DP – Dieta Padrão

DP+R – Dieta Padrão + Treino Resistido

DTNB - Ácido 2-nitrobenzóico (5,5'-Dithiobis)

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EPIC - Investigação Prospectiva Européia sobre Câncer e Nutrição (do *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*)

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês *Extracellular signal-regulated kinase*)

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FADH – Dinucleotídeo de Flavina e Adenina

GLUT4 – Transportador de Glicose 4

GPx – Glutathione Peroxidase

GSH – glutathione reduzida

GSK-3 – Glicogênio Sintase Quinase 3

GSSG – glutathione oxidada

HIF1 – Fator Induzido por Hipóxia 1

HO[•] – Hidroxila

HO1 – Heme Oxigenase 1

HPLC - Cromatografia Líquida de alta performance, do inglês (*high performance liquid chromatography*)

IKK – Quinase Indutora do *Kappa B*

IL1 β – Interleucina 1 beta

IL6 – Interleucina-6

IMC – Índice de Massa Corporal

INSR – Receptor de Insulina (do inglês *Insulin receptor*)

IRS – Substrato do Receptor de Insulina (do inglês *Insulin receptor substrate*)

I κ B – Quinase Inibidora do Fator *Kappa*

JNK - c-Jun quinases terminais N (do inglês *c-Jun N-terminal kinases*)

LABIM – Laboratório de Biologia Molecular e Celular

LAFIBE – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício

LDH – Lactato Desidrogenase

LPS – Lipopolissacarídeos

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês *Mitogen-activated protein kinase*)

MCP1 - Proteína quimiotática de monócitos 1 (do inglês *Monocyte chemoattractant protein 1*)

MDA – Malondialdeído

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *Messenger Ribonucleic acid*)

NADH – Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NADPH - Nicotinamida adenina Dinucleotídeo fosfato reduzida
NaOH – hidróxido de sódio
NFκB – Fator Nuclear *Kappa* B
NO – Óxido Nítrico
NQO1 – NADPH Quinona Oxirredutase 1
O₂⁻ – Ânion Superóxido
OMS – Organização Mundial de Saúde
ONOO⁻ – Peróxido Nitrito
PAI-1 – Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1
PDK1 – Quinase Dependente de Fosfoinositido 1
PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2 – Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP3 – Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PKC – Proteína Quinase C
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês *Phenylmethylsulfonyl fluoride*)
PPGCS – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Ppia – Peptidilprolil Isomerase A (do inglês *Peptidylprolyl Isomerase A*)
PURE - Estudo Epidemiológico Urbano e Rural Prospectivo (do inglês *Prospective Urban and Rural Epidemiological Study*)
PVDF – Difluoreto de Polivinilideno (do inglês *Polyvinylidene Difluoride*)
Rac1 – Substrato da toxina botulínica C3 relacionado a Ras 1 (do inglês *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)
RM – Repetição Máxima
SDH – Succinato Desidrogenase
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*)
SDS-PAGE – Gel de Eletroforese de Dodecil Sulfato de Sódio-Poliacrilamida
SOD – Superóxido Dismutase
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TCA – ácido tricloroacético
TLR4 – Receptor *Toll Like 4*
TNFα – Fator de Necrose Tumoral α
TTI – Teste de Tolerância à Insulina
UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

SUMÁRIO

Sumário

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBESIDADE E SOBREPESO.....	20
1.1.1 Dados históricos.....	20
1.1.2 Definição e dados epidemiológicos	21
1.2 OBESIDADE E SUA RELAÇÃO COM A DIABETES MELITUS TIPO 2 E A RESISTÊNCIA À INSULINA.....	23
1.2.1 Aspectos moleculares da sinalização da insulina no tecido muscular esquelético	25
1.3 OBESIDADE E O PROCESSO INFLAMATÓRIO	30
1.4 OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	32
1.6 EXERCÍCIO RESISTIDO NO PROCESSO DE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA.....	35
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	39
3.2 ANIMAIS.....	39
3.3 DIETA.....	40
3.4 PESO CORPORAL, ÍNDICE DE ADIPOSIDADE E TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (TTI)	41
3.5 TREINAMENTO	42
3.6 EUTANÁSIA	43
3.7 WESTERN BLOT	43
3.8 EXTRAÇÃO RNA E EXPRESSÃO GÊNICA – REAL-TIME RT-QPCR.....	44
3.9 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	46
3.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	47
3.10.1 Oxidação de diclorodihidrofluorescína (DCFH)	47
3.10.2 Carbonilação de proteínas	48
3.10.3 Atividade de enzimas antioxidantes	48

3.10.4 Níveis de glutathiona.....	49
3.10.5 Lipoperoxidação	49
3.11 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS	50
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS	52
4.1 EFEITOS DO PROTOCOLO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA NO PESO CORPORAL E RESISTÊNCIA À INSULINA (PRÉ- RANDOMIZAÇÃO).....	52
4.2 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, NO PESO CORPORAL E NO PERFIL TECIDO ADIPOSEO BRANCO	55
4.3 EFEITO DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA NO PERFIL HISTOLÓGICO DO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO	59
4.4 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, NA RESISTÊNCIA À INSULINA	60
4.5 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, NA SINALIZAÇÃO MOLECULAR E NA MODULAÇÃO GÊNICA DA CAPTAÇÃO DE GLICOSE NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO	63
4.5.1 Western Blot.....	63
4.5.2 PCR.....	65
4.6 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DAS MAPK'S NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO	66
4.7 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO.....	67
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICE A – Figura Suplementar 1	117
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Em Animais (CEUA – UNESC).....	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E SOBREPESO

1.1.1 Dados históricos

Dados retirados do PubMed revelam que a palavra “Obesity” aparece citada pela primeira vez em um relatório de autópsia de um caso descrito como “extrema obesidade”, datado do ano de 1877. O médico do relato (Oliver, 1880) descreve um paciente extremamente grande, de 50 anos de idade, pesando aproximadamente 200kg. De acordo com relatos de parentes, o indivíduo consumia enormes quantidades de comida e nos últimos meses antes da morte, não conseguia mais se locomover. O relatório descreve que durante a autópsia o médico encontrou grandes quantidades de gordura, principalmente abdominal subcutânea e intra-abdominal, uma camada muito fina do músculo reto abdominal, acúmulo importante de gordura também ao redor dos rins e do coração, e falência de múltiplos órgãos com aparente alteração do fígado.

Outro relato no periódico *The Hospital London*, com data de 1891, traz a obesidade como um acúmulo de gordura nos tecidos subcutâneos e ao redor dos órgãos internos e, além de ser inconveniente, é um processo de doença (“Obesity: Its Causes and Treatment”, 1891). O artigo diz que homens e mulheres que ganham peso não deveriam receber congratulações pois, obviamente, eles não conseguem ter controle sobre o que comem. Os autores também citam que a atividade mental diminuída é tanto fator de causa como de consequência para a obesidade. Relatam que outro fator que leva à doença é o consumo de álcool e a falta de atividade física. Sobre esta, destacam que pessoas preguiçosas tenham tendência a se movimentar menos e ganhar peso.

Como doença, a definição de obesidade, suas complicações e seu impacto na saúde começaram a ser registradas no século XVIII, e somente em meados do século XIX foi reconhecida como distúrbio de saúde. Após os avanços tecnológicos do século XVIII, também conhecido como a segunda revolução da agricultura, seguido do crescimento econômico que emergiu no pós-segunda guerra mundial no século XX, as consequências começaram a aparecer: o crescente aumento da oferta de alimentos acompanhado de avanços tecnológicos que desencadearam em redução

da atividade física diária. Com isso, ocorreu o surgimento do excesso de peso e a obesidade – fácil acesso à uma quantidade interminável de comida, com o mínimo de energia gasta para obtê-la (Eknoyan, 2006).

1.1.2 Definição e dados epidemiológicos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a obesidade e sobrepeso como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta riscos à saúde e que pode levar a efeitos metabólicos adversos sobre a pressão arterial, alterar colesterol, triglicerídeos e levar a resistência à insulina. Estes riscos aumentam significativamente com o aumento do Índice de Massa Corporal (IMC). O sobrepeso e a obesidade também estão relacionados ao aumento da taxa de mortalidade (WHO, 2019).

O IMC é uma medida populacional que classifica níveis de sobrepeso e obesidade e é obtido a partir do peso de uma pessoa (em quilogramas) dividido pelo quadrado da sua altura (em metros ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$)) (WHO, 2019). O grau de obesidade pode ser definido de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Classificação internacional de obesidade segundo o Índice de Massa Corporal (IMC) e riscos de doenças

IMC (Kg/m ²)	Classificação	Obesidade grau/classe	Risco de doença
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5 – 24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25 – 25,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30 – 34,9	Obesidade	I	Elevado
35 – 39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥40	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

Fonte: World Health Organization (WHO, 2019).

Porém, a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO) sugerem haver diferenças na composição corporal em função do sexo, idade, etnia, no cálculo em indivíduos sedentários quando comparados com atletas, ou em indivíduos idosos ou edemaciados, e que por isso, o IMC não reflete a distribuição real de gordura corporal. Também afirma que a medida de distribuição de gordura é importante na avaliação do sobrepeso e da obesidade porque a gordura

visceral é um fator de risco potencial para a doença, independente da gordura corporal total. Portanto, o ideal é que o IMC seja usado em conjunto com outros métodos de determinação de gordura corporal (ABESO, 2016).

Considerada uma epidemia global, a obesidade é um dos problemas de saúde pública mais emergentes da atualidade. A OMS, em seu repositório de dados do *Global Health Observatory* apresenta relatórios com abrangência de 1975 a 2016 (dados atualizados em setembro 2017), e relata que 39% dos homens e 39% das mulheres com mais de 18 anos estão com sobrepeso (IMC ≥ 25 kg/m²), e que 11% dos homens e 15% das mulheres são consideradas obesas (IMC ≥ 30 kg/m²). Assim, quase 2 bilhões de adultos em todo o mundo estão com sobrepeso e, destes, mais de meio bilhão são obesos. A projeção para 2025 é que cerca de 2,5 bilhões de adultos estejam com sobrepeso, e mais de 700 milhões, obesos (WHO, 2019). Na Tabela 2 encontram-se os valores de prevalência de sobrepeso e obesidade da população brasileira nos anos de 1975, 2000 e 2016 para ambos os sexos, e para homens e mulheres separadamente. Avaliando a região sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), 35,9% das crianças entre 5 e 9 anos, 24,6% dos adolescentes entre 10 e 19 anos, e 56,08% dos adultos acima de 19 anos já apresentam sobrepeso (ABESO, 2019). É a região do país com a maior prevalência de sobrepeso entre adolescentes e adultos.

Tabela 2: Prevalência de sobrepeso e obesidade entre adultos (+18 anos) no Brasil

Sobrepeso (IMC ≥ 25)			
Ano	Ambos os sexos	Homens	Mulheres
1975	27,5% (22.1-33.4)	24,6% (17.0-33.1)	30,2% (22.7-38.6)
2000	46% (43.1-49.0)	44,8% (40.4-49.1)	47% (43.0-50.9)
2016	46,5% (52.3-60.7)	57,6% (51.5-63.5)	55,4% (49.6-61.4)
Obesidade (IMC ≥ 30)			
Ano	Ambos os sexos	Homens	Mulheres
1975	5,2% (3.3-7.9)	3% (1.4-5.7)	7,3% (4.0-12.0)
2000	14,5% (12.6-16.6)	11% (8.5-13.6)	17,8% (14.9-20.9)
2016	22,1% (18.7-25.7)	18,5% (14.1-23.5)	25,4% (20.4-30.7)

Fonte: *Global Health Observatory data repository*. Última atualização – setembro/2017. (WHO, 2019).

A causas da obesidade são multifatoriais e podem incluir causas médicas como fatores genéticos, uso de medicamentos e alterações metabólicas; como também influências socioeconômicas como o fácil acesso à alimentos altamente calóricos, rotinas diárias, rotinas de trabalho e atividades de lazer com mínimas necessidades de atividade física. Este é um consenso em várias agências de saúde ao redor do mundo (NHS, 2016; CDC, 2019; Ministério da Saúde, 2019).

O sobrepeso e a obesidade também se apresentam como fatores de riscos importante para comorbidades relacionadas ao estilo de vida como doenças cardiovasculares, Diabetes Melitus Tipo II (DMT2), resistência à insulina, síndrome metabólica, e vários tipos de câncer (Fernández-Sánchez et al., 2011). A presença dessas complicações crônicas é a principal causa do alto índice de mortalidade e incapacidade da população com diabetes. Recentemente foi publicado na revista *Lancet* uma avaliação da Comissão Sobre Dietas Saudáveis a partir de Sistemas Alimentares Sustentáveis que traz que, além do consumo excessivo de alimentos, a obesidade e suas comorbidades associadas também estão diretamente relacionadas ao consumo de alimentos de baixa qualidade que levam a deficiência de micronutrientes, e contribuem substancialmente para o quadro. Ainda, sugerem que dietas não saudáveis representam um risco ainda mais elevado de morbidade e mortalidade do que os riscos de sexo não seguro, uso de álcool, tabaco e drogas quando associados (Willett et al., 2019).

1.2 OBESIDADE E SUA RELAÇÃO COM A DIABETES MELITUS TIPO 2 E A RESISTÊNCIA À INSULINA

A epidemia de obesidade associada ao diabetes constitui um problema de saúde pública mundial. De acordo com a OMS, o número de adultos vivendo com diabetes quase que quadruplicou desde 1980. Com dados atualizados em 2014, a organização contabiliza 422 milhões de adultos com a doença. Esse drástico aumento é, em grande parte, devido ao aumento da DMT2 e sua relação causal com o sobrepeso e a obesidade. No relatório global sobre a diabetes, mais uma vez é chamada a atenção para o sobrepeso e a obesidade como principais fatores de risco para o desenvolvimento de DMT2 (WHO, 2016). Estima-se que cerca de 90% do DMT2 seja atribuível ao excesso de peso (Hossain et al., 2007).

A literatura traz o termo “diabesidade” (do inglês *diabesity*) que expressa a estreita relação entre as patologias, detalhando que em ambas os distúrbios metabólicos são caracterizados por defeitos na ação da insulina (Serván, 2013; Leitner et al., 2017; Pappachan e Viswanath, 2017; Verma e Hussain, 2017). A relação direta da obesidade com a DMT2 se dá através de um complexo processo metabólico caracterizado por alteração da homeostase da captação de glicose (Mukherjee et al., 2013). Dois fatores são reconhecidos como os principais componentes: a resistência à insulina e a deficiência de insulina. A hiperglicemia crônica, devido à fenômenos de glicotoxicidade, prejudica a sensibilidade da insulina, enquanto a hiperinsulinemia prolongada inibe tanto a secreção de insulina, como a ação da mesma (Felber e Golay, 2002).

A resistência à insulina é uma doença metabólica que se caracteriza em um nível normal ou elevado de insulina onde uma resposta biológica é reduzida na presença do hormônio (Cefalu, 2001). Sua relação com a diabetes está delineada em estágios, caracterizados por variações dos parâmetros metabólicos e alteração da função das células β -pancreáticas, responsáveis pela produção e liberação de insulina. Weir e Bonner-Weir (2004) relatam que no início da doença a glicemia de jejum pode sofrer alterações que não são clinicamente reconhecidos como anormais (de 80 mg/dL para 89 mg/dL, por exemplo), porém podem ser prejudiciais se mantidos por longos períodos de tempo (estágio 0). Pacientes podem permanecer anos sem apresentar alterações clínicas até desenvolver a diabetes. Os autores também trazem a progressão da doença classificada em mais 5 estágios (Weir e Bonner-Weir, 2004):

- Estágio 1 (compensação): a secreção de insulina aumenta para compensar a hiperglicemia, e manter os níveis de glicose sanguínea normais;

- Estágio 2 (adaptação estável - estágio pré-diabético): não é possível definir precisamente a faixa de valores de glicose, mas é o estágio onde a glicemia pode variar para aproximadamente 89-130 mg/dL. Neste estágio, as células β -pancreáticas não podem mais ser classificadas como em período de compensação, pois notoriamente não estão mais produzindo insulina suficiente para manter os níveis de glicose dentro de valores normais;

- Estágio 3 (descompensação precoce – estágio limítrofe): a glicose sanguínea sobe rapidamente dos valores de 130 mg-dL para atingir o estágio 4;

- Estágio 4 (descompensação estável): com valores elevados (258-350 mg/dL). Inicia então um processo de descompensação das células β -pancreáticas,

onde elas não conseguem mais produzir insulina suficiente para baixar os valores glicêmicos, e ocorre a instalação do quadro de diabetes. Essa falha possivelmente ocorre devido a declínio crítico da massa das células β -pancreáticas (~50%), e aumento da resistência à insulina. Este estágio pode durar uma vida toda para a maioria dos indivíduos;

- Estágio 5 (descompensação severa): é conhecido como o último estágio da diabetes e é marcado por perda severa das células β -pancreáticas, importante perda de peso, cetose, e dependência de insulina para sobrevivência. Mais comum em pacientes com diabetes tipo 1, e raro, porém possível, em pacientes com DMT2.

Os efeitos da insulina variam de acordo com a função fisiológica de cada tecido e órgão, e de acordo com suas dependências de insulina em seus processos metabólicos (Cherrington et al., 2007; Benito, 2011; Nelson e Cox, 2014). O sistema de homeostase da glicose é alcançado por meio de funções coordenadas de vários órgãos e sistemas, incluindo o músculo esquelético, o fígado, o pâncreas endócrino, o tecido adiposo, e alguns neurônios específicos do hipotálamo. O fígado contribui com a regulação primária da glicose com a produção hepática. O tecido adiposo é um dos tecidos que utiliza a glicose de forma insulino-dependente e atua como um órgão endócrino liberando adipocinas. As células pancreáticas α e β são os locais da síntese e secreção da insulina e do glucagon, respectivamente. O hipotálamo atua na neuroregulação desse órgãos (Nelson e Cox, 2014).

1.2.1 Aspectos moleculares da sinalização da insulina no tecido muscular esquelético

Como já mencionado, os tecidos definidos como dependentes de insulina, baseado no transporte intracelular de glicose, são principalmente o tecido adiposo e o tecido muscular (Boucher et al., 2014). O músculo esquelético é um tecido com alto consumo e capacidade de armazenamento de energia. A insulina sinaliza para o músculo esquelético que a glicose sanguínea é abundante. Conseqüentemente, a cascata de sinalização de insulina dos miócitos é especializada em promover a captação de glicose e a síntese de glicogênio (Petersen e Shulman, 2018). A insulina aumenta a captação de glicose nas células musculares estimulando a translocação da vesícula chamada Transportador de Glicose 4 (GLUT4). Até 75% da captação de glicose dependente de insulina ocorre no tecido muscular esquelético, enquanto o

tecido adiposo contabiliza este consumo somente com uma pequena fração (Klip e Pâquet, 1990). Para melhor compreensão da resistência à insulina é necessário compreender como ocorre a transdução do sinal insulínico.

A ação do hormônio inicia com sua ligação ao receptor de membrana chamado Receptor de Insulina (INSR). Esses receptores são proteínas heterotetraméricas constituídas por duas subunidades alfa (α) e duas subunidades beta (β) (Patti e Kahn, 1999). A ligação da insulina com os receptores- α induz alterações conformacionais nas subunidades- β e libera a *cis*-autoinibição na alça de ativação da quinase, e permite a trans-autofosforilação dos resíduos de tirosina Tyr1162, Tyr1158, e Tyr1163, nesta ordem, permitindo o recrutamento e fosforilação de substratos (Petersen e Shulman, 2018). Os substratos são membros da família de proteínas do Substrato do Receptor de Insulina (IRS), simplesmente denominadas IRS-1 a IRS-6, que atuam como arcabouços para organizar e mediar complexos de sinalização. A fosforilação das proteínas IRS's cria sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), promovendo seu recrutamento e ativação. Essa ação depende da ligação de dois domínios SH2 da PI3K com as subunidades regulatórias das proteínas IRS. Isso resulta na ativação da subunidade catalítica que fosforila rapidamente o Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para gerar o segundo mensageiro lipídico Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). Este último recruta a Proteína Quinase B (Akt/PKB) para a membrana plasmática, onde é ativada por fosforilação e induz sinalização *downstream* do sinal insulínico (Saltiel e Kahn, 2001; Boucher et al., 2014). Além disso, a PI3K possui atividade serina quinase, e ambas as subunidades catalítica e regulatória da enzima podem interagir com a sinalização de outras proteínas. Alguns estudos demonstram que essa proteína pode ser importante para a ação da insulina independentemente da geração da PIP3 (Kessler et al., 2001). Por isso, a PI3K constitui um ponto de bifurcação da sinalização da insulina, ativando duas cascatas separadas tipificadas pela ativação da serina/treonina quinase Akt, e da família *Rho-family small GTPase* Rac1, que em paralelo promovem a translocação GLUT4 (Figura 1).

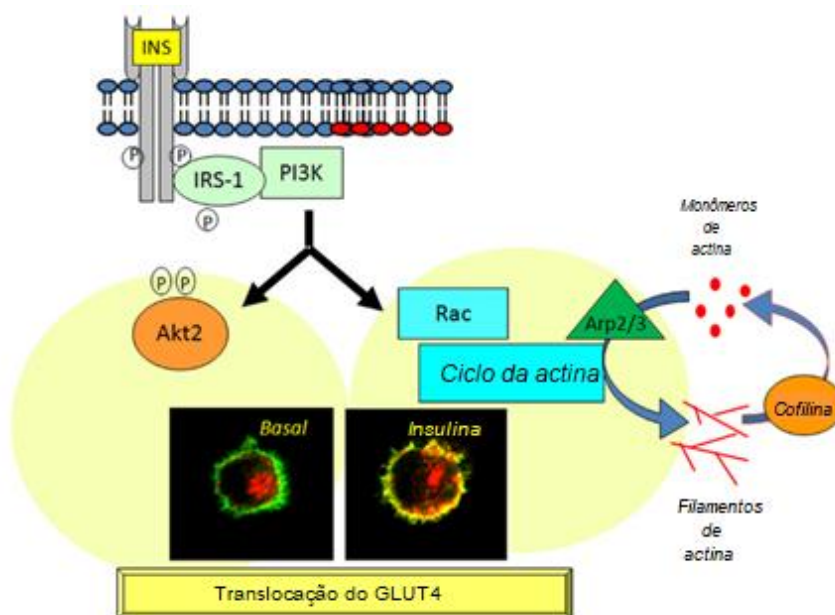


Figura 1: Bifurcação da sinalização da insulina (INS) levando a translocação do GLUT4. A sinalização *downstream* do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) na cascata de sinalização da insulina com bifurcação de informações segregadas em dois braços independentes tipificados pela ativação da proteína quinase B (Akt) e do substrato da toxina botulínica C3 relacionado a Ras 1 (Rac), ambos levando à translocação do GLUT4 para a membrana. A Rac estimula o ciclo contínuo da actina marcado por ramificações de actina e despolimerização de filamentos, controlado por Arp2/3 e cofilina, respectivamente. As estruturas de actina dinâmicas induzidas por insulina servem para ligar e concentrar as vesículas de GLUT4 nas proximidades da membrana plasmática. As imagens de fluorescência mostram as vesículas de GLUT4 coradas em vermelho e a membrana plasmática corada em verde, ambas em mioblastos L6GLUT4myc arredondados. A presença do GLUT4 na membrana plasmática está corada em amarelo. IRS-1 – substrato do receptor de insulina 1. Figura adaptada de Klip et al. (2014).

Já a Proteína Quinase B (PKB), também conhecida como Akt, é uma proteína quinase específica de serina e treonina que tem um papel importante em múltiplas funções celulares como crescimento, sobrevivência e proliferação celular, e dentre elas, o metabolismo da glicose. Três isoformas homólogas já foram identificadas: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , e Akt3/PKB γ (Mackenzie e Elliott, 2014). Em um estudo sobre a sinalização específica de cada isoformas da Akt durante a exposição à insulina, a Akt foi ativada pela fosforilação *downstream* da PI3K nos resíduos de Thr308/9 e Ser473/4 (Akt1 e Akt2, respectivamente). A isoforma Akt2 também apresentou um acúmulo na membrana duas vezes superior à isoforma Akt1. Em avaliação da correlação das isoformas com a habilidade de translocar o GLUT4 para a membrana, somente a presença da Akt2 membrana foi capaz de efetivamente induzir a captação de glicose por translocação do GLUT4 (Gonzalez e McGraw, 2009). No tecido muscular esquelético, ambas Akt1 e Akt2 estão presentes, mas a Akt2 parece ser mais importante para o metabolismo da glicose dependente de insulina. A alteração

do RNA da Akt2 em cultura primária de miotubos humanos anulou a captação de glicose e a síntese de glicogênio estimuladas por insulina, enquanto o silenciamento da Akt1 não teve efeitos sobre esses parâmetros (Bouzakri et al., 2006). A Akt é capaz de fosforilar o Substrato de Akt 160 kDa (AS160), também conhecido como TBC1D4. A fosforilação pela Akt inativa a AS160, facilitando a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, aumentando assim a atividade de transporte de glicose. Em geral, a fosforilação deste substrato pode ser tida como a “liberação dos freios” da translocação do GLUT4 para a membrana da célula, e subsequente captação de glicose (Petersen e Shulman, 2018). A Akt também tem participação na via de síntese de glicogênio estimulando a inativação da Glicogênio Sintase Quinase (GSK3) através da fosforilação de resíduos de serina (Ser21 na GSK3 α e Ser9 na GSK3 β). Este processo leva à desfosforilação da Glicogênio Sintase e ativação da via da glicogênese no tecido muscular (Jope et al., 2007; Hermida et al., 2017). Todos os processos descritos acima se encontram sumarizados na Figura 2.

Por outro lado, a via de sinalização da insulina pode ser regulada negativamente através da Proteína Tirosina Fosfatase (PTB1B) e da Fosfatase Homóloga a Tensina (PTEN). A proteína PTP1B, uma fosfatase, pode desfosforilar os resíduos de fosfotirosina das subunidades- β do INSR assim como das proteínas IRS. Já PTEN regula negativamente os níveis intracelulares de PIP3. Outro ponto de regulação negativa é a fosforilação em resíduo de serinas dos IRS's, principalmente o IRS1. Algumas das proteínas quinases envolvidas nesse processo são as Quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a S6 quinase (S6K), as c-Jun quinases terminais N (JNK). Estas podem ser ativadas pelo próprio sinal insulínico e atuar como feedback negativa da via (Hirosumi et al., 2002; Taniguchi et al., 2006).

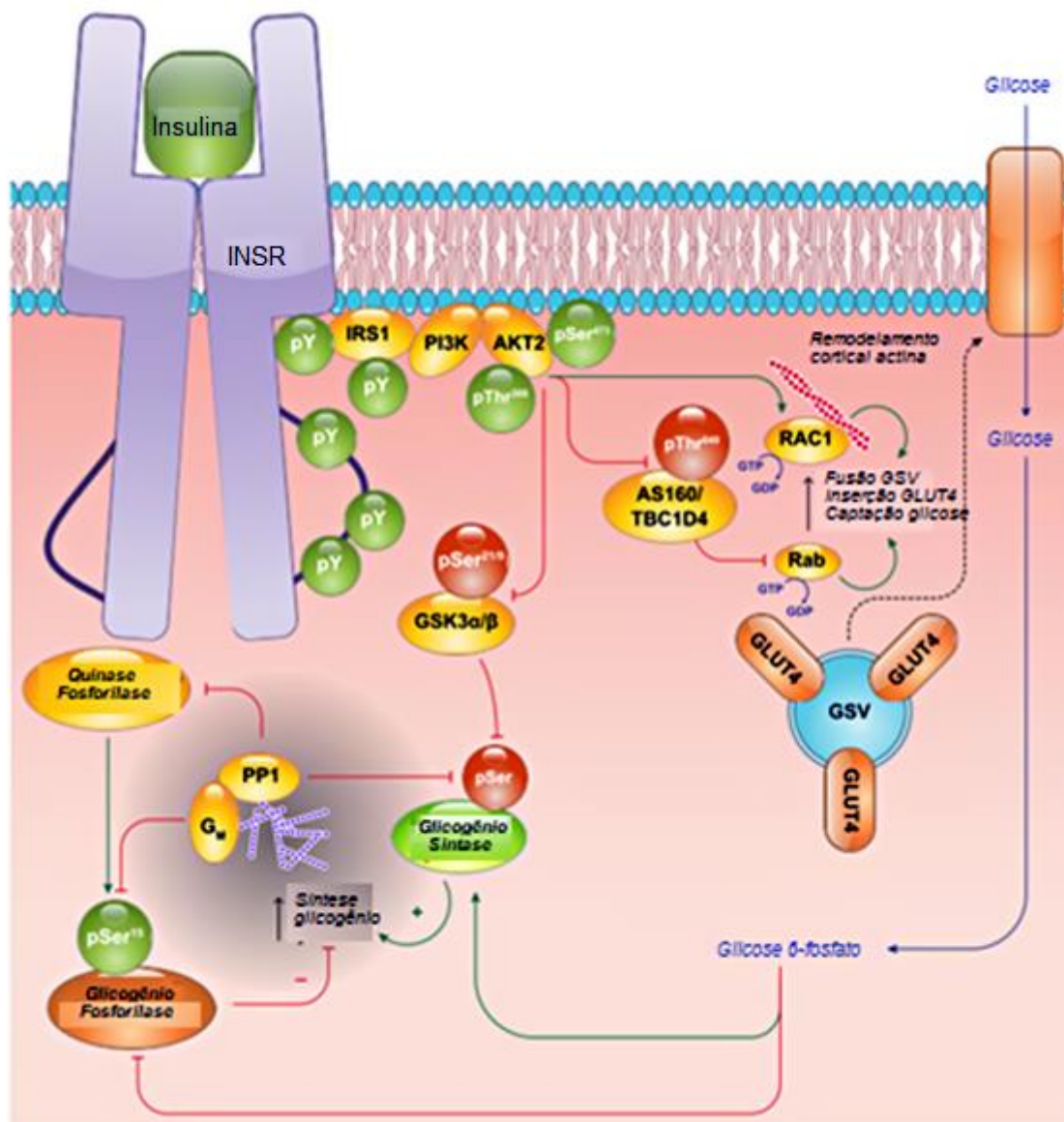


Figura 2: Cascata de sinalização da insulina no tecido muscular esquelético. A ativação do receptor de insulina (INSR) tem duas funções metabólicas principais nos miócitos esqueléticos: captação de glicose e estocagem de glicogênio. A captação de glicose estimulada por insulina ocorre através da translocação de vesículas de estoque contendo GLUT4 (GVS) até a membrana plasmática. O resultante aumento da produção de glicose-6-fosfato, juntamente com uma desfosforilação coordenada de proteínas do metabolismo do glicogênio, permite a síntese de glicogênio. Os círculos e as flechas verdes representam estes eventos; os círculos e as flechas vermelhas representam os fatores inibitórios do mesmo. Figura adaptada de Petersen e Shulman (2018).

A via da ERK/JNK também pode ser ativada pelo processo inflamatório e inibir a via de sinalização de insulina. Isso ocorre através do Fator de Necrose Tumoral α (TNF α). TNF α se liga ao Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral α (TNFR1) e além de ativar JNK, ativa outra proteína inflamatória, a Quinase Indutora do *Kappa B* (IKK), que também é ativada por Lipopolissacarídeos (LPS) e Ácidos Graxos Livres (AGL), através da ligação ao Receptor *Toll Like 4* (TLR4). Essas vias fosforilam e ativam IKK,

que promove a dissociação do Fator Nuclear *Kappa* B (NFκB) da Quinase Inibidora do Fator *Kappa* (IκB), uma proteína com função de manter NFκB ancorado no citosol. IκB é ubiquitinado via proteossoma e NFκB induz a transcrição de vários mediadores inflamatórios, que poderão atuar sinergisticamente na inibição da via de sinalização da insulina (Engin, A., 2017) (Figura 3).

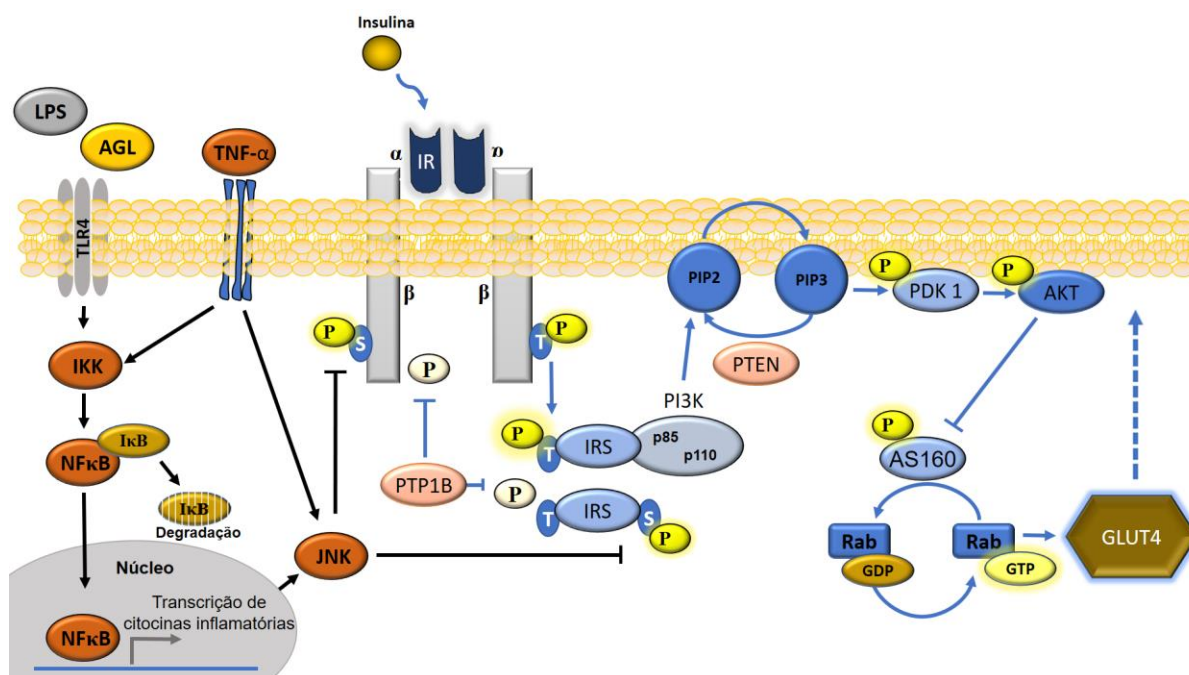


Figura 3: Via da sinalização na captação de glicose e a influência de citocinas, ácidos graxos livres (AGL) e lipopolissacarídeos (LPS) no processo de resistência à insulina. A insulina, ao se ligar ao seu receptor de membrana (IR), promove a autofosforilação da subunidade beta expondo seus resíduos de tirosina e desencadeado uma cascata de sinalizações que convergem para as vesículas que contêm transportador de glicose 4 (GLUT-4), promovendo seu transporte para a membrana celular e consequente captação de glicose. Esta via pode ser regulada negativamente pelas fosfatases PTP1B e PTEN ou pela proteína pró-inflamatória JNK, que causa fosforilação em serina do receptor de insulina (IR) e de seus substratos (IRS). Figura elaborada por Pieri (2017).

1.3 OBESIDADE E O PROCESSO INFLAMATÓRIO

O tecido adiposo branco é o principal local de início e exacerbação da inflamação associada à obesidade (Maury e Brichard, 2010). Originalmente considerado um passivo local de estoque de energia, o tecido adiposo branco é hoje conhecido por secretar uma variedade de substâncias que regulam a homeostase metabólica (Trayhurn et al., 2011). Deste modo, o tecido adiposo é um órgão secretor complexo e ativo que tanto envia como recebe sinais que modulam o gasto energético, o apetite, a sensibilidade da insulina, funções endócrinas e reprodutivas, o

metabolismo dos ossos, processos inflamatórios e processos imunes (Shoelson et al., 2006).

O processo de obesidade, proveniente de um balanço energético positivo, leva ao acúmulo de gordura e aumenta o número de adipócitos (hiperplasia), como também o tamanho da célula (hipertrofia). Estes processos podem causar alterações metabólicas e imunes do tecido adiposo, levando à ativação do processo inflamatório e da resistência à insulina. Os adipócitos promovem a inflamação por meio de sua própria produção de citocinas e quimiocinas, também chamadas de adipocinas (Blüher, 2009). O processo de hipóxia devido à expansão do tecido adiposo é uma das hipóteses da ativação do processo inflamatório. Foi demonstrado que tecido adiposo branco de ratos obesos são hipoperfundidos e sofrem hipóxia. Isso ativa a via do Fator Induzido por Hipóxia 1 (HIF1) que leva ao estresse de retículo e, como consequência, ocorre a desregulação da produção de adipocinas e início do processo inflamatório no tecido adiposo (Hosogai et al., 2007).

O processo inflamatório inicia com o recrutamento e aumento do número de macrófagos no tecido adiposo, e o aumento da presença de moléculas pró-inflamatórias, incluindo, Fator de Necrose Tumoral- α (TNF α), Interleucina-6 (IL6), Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1 (PAI-1), Proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) também conhecida como CCL2, dentre outros (Shimomura et al., 1996; Fried et al., 1998; Tilg e Moschen, 2006). A exacerbação deste processo leva ao processo de resistência à insulina do tecido adiposo (Shoelson et al., 2006), aumento da lipólise para conter o acúmulo em excesso de TAG no adipócito, e subsequente liberação de AGL para a corrente sanguínea (Arner, 2005), bem como a transposição à nível sistêmico do processo inflamatório, caracterizando o processo de inflamação crônica de baixo grau (Maury e Brichard, 2010).

A função endócrina das adipocinas, atuando em outros tecidos, tem influência direta no tecido muscular esquelético. Além do processo de resistência à insulina, a exposição crônica à citocinas parece ter efeitos distintos na proliferação e diferenciação de mioblastos, na função das células satélites e na massa e função muscular (Sinha et al., 2017). Como observado na Figura 3, citocinas, AGL e LPS presentes na corrente sanguínea também podem se ligar a receptores de membrana como o TNFR1 e TLR4, e ativar cascatas relacionais ao processo inflamatório no interior da célula muscular. Adicionalmente, as células musculares têm a capacidade de expressar TNF α e outras citocinas inflamatórias (Saghizadeh et al., 1996; Wu et

al., 2013; Patsouris et al., 2014), processo esse diretamente relacionado à resistência à insulina.

1.4 OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) com consequente desequilíbrio redox e estresse oxidativo está diretamente relacionada ao desenvolvimento da obesidade (Catalán et al., 2018). As ERO são moléculas quimicamente reativas formadas a partir da redução univalente do oxigênio molecular gerando o radical Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e intermediários reativos como Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e radical Hidroxila ($HO^{\cdot-}$); e quando interage com Óxido Nítrico (NO) pode levar a formação de Peróxido Nitrito ($ONOO^-$) (D'Autréaux e Toledano, 2007; Halliwell e Gutteridge, 2015). Está bem estabelecido o importante papel que as ERO possuem em concentrações fisiológicas, na manutenção das funções celulares dependendo da quantidade e do local onde são produzidas. Níveis fisiológicos regulam a sinalização celular, modulam o sistema antioxidante para adaptar-se à níveis mais elevados de ERO, mantêm o equilíbrio entre fatores de transcrição e entre proteínas pró e anti-apoptóticas, regulam a função mitocondrial assim como outros eventos da homeostase celular (Barbieri e Sestili, 2012). Entretanto, elevados níveis de ERO com declínio simultâneo do sistema de defesa antioxidante leva a possíveis danos a biomoléculas resultando no processo de estresse oxidativo e consequente disfunção ou morte celular, assim como no desenvolvimento de doenças associadas à obesidade, como a resistência à insulina (Henriksen et al., 2011; Rains e Jain, 2011).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, é um importante regulador de eventos celulares, inclusive do transporte de glicose no músculo esquelético, porém sua relação com a resistência à insulina ainda não está bem elucidada, e parece estar relacionada com os níveis presentes nos ambientes celulares. Seu efeito benéfico pode estar associado ao fato de um dos principais alvos da ERO, para promover a sinalização dependente de fosforilação de resíduos de tirosina, são as PTP's, fosfatases que desfosforilam a PIP3 e bloqueiam a sinalização da PI3K, e a ação da insulina (Rhee, 2006; Tonks, 2006). Trabalhos demonstram que animais com bloqueio de uma das principais enzimas envolvidas na eliminação fisiológica das ERO, a glutathione peroxidase 1 (GPx1), foram protegidos da resistência à insulina induzida

por dieta hiperlipídica, e essa proteção foi associada à oxidação da PTP's por ERO, e revertida com o uso do antioxidante N-acetilcisteína (ver revisão de Loh et al., 2009). Aparentemente, o bloqueio de uma das principais enzimas antioxidantes levou à melhora do quadro de resistência à insulina, assumindo que as ERO agem como segundos mensageiros no processo, e não como agentes danosos (Rhee, 2006; Loh et al., 2009).

Porém vários estudos demonstram os efeitos causais e danosos do estresse oxidativo no processo de obesidade (revisões em Henriksen et al., 2011; Aroor e DeMarco, 2014; Di Meo et al., 2017b). Por isso, o grau de geração de ERO e o contexto que determina se as ERO aumentam ou suprimem a sensibilidade à insulina, seja o fator determinante. Enquanto as ERO transitórias produzidas por estímulos fisiológicos podem ser benéficas, a geração crônica associada à hiperglicemia e/ou hiperlipidemia, na obesidade, pode promover resistência à insulina (Loh et al., 2009). Dois trabalhos sustentando esse contexto foram conduzidos em músculo esquelético isolado de ratos. Na ausência da insulina, a presença do H_2O_2 , dentro de uma faixa de concentração pequena (60-90 μ M por 2 horas), aumentou a atividade basal de transporte de glicose intracelular e síntese de glicogênio através do aumento da fosforilação de resíduos de tirosina do receptor de membrana, a associação do IRS-1 com a PI3K e a fosforilação da Akt Ser⁴⁷³. Também foi capaz de aumentar a atividade da Proteína Quinase Ativada por 5' Adenosina Monofosfato (AMPK) (Kim et al., 2006). Em período mais prolongado de exposição, (4 horas) e na presença de insulina, a presença do H_2O_2 induziu importantes prejuízos na captação de glicose associados com perda seletiva das proteínas IRS-1 e IRS-2, aumento relativo da fosforilação de IRS-1 Ser³⁰⁷, e importante diminuição da fosforilação da Akt Ser⁴⁷³ e da GSK3- β Ser⁹ (Archuleta et al., 2009). Também foi observado o aumento da atividade da via das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK's), como a p38 MAPK e a JNK induzidas por ERO (Archuleta et al., 2009; Vichaiwong et al., 2009), principalmente a isoforma JNK1 (Hirosumi et al., 2002).

A produção contínua e em excesso de ERO, durante os processos metabólicos, leva à modulação dos mecanismos de defesa endógenos. como a atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathiona Peroxidase (GPx), Tiorredoxina Redutase entre outras moléculas que compõem o sistema antioxidante enzimático (Halliwell e Gutteridge, 2015). A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação

do O_2^- para H_2O_2 (Zelko et al., 2002). A CAT é uma dismutase que reduz um H_2O_2 em água (H_2O) e oxida o segundo H_2O_2 à Oxigênio (O_2). Já a GPx remove H_2O_2 , acoplando sua redução à H_2O com oxidação de Glutathione (GSH). As GPxs são tetrâmeros obrigatórios, cada um contendo uma Selenocisteína (Cys-SeH) no seu local ativo. Durante o mecanismo catalítico de GPx, o resíduo Cys-SeH reage com H_2O_2 para produzir Ácido Cisteínico Selenênico (Cys-SeOH) (Rhee et al., 2005). Em adição, o sistema de defesa antioxidante não enzimático é constituído por antioxidantes que incluem proteínas de ligação com metal, GSH, ácido úrico, melatonina, bilirrubina e poliaminas, dentre outros (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018).

Durante o processo de obesidade associado ao consumo excessivo de alimentos, a hiperglicemia crônica e a alta concentração de AGL e LPS na corrente sanguínea são fatores que pode levar ao aumento da produção de ERO no interior da célula muscular e ao quadro de estresse oxidativo (Lin et al., 2006; Fiorentino et al., 2013; Ly et al., 2017) . O fluxo exagerado de glicose através da glicólise e do ciclo de Krebs resulta na produção de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (NADH) e Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FADH) que, quando excessivos, podem sobrecarregar a cadeia respiratória mitocondrial e aumentar a formação de O_2^- . Da mesma forma, o aumento do fluxo de lipídios através da beta-oxidação também pode contribuir para um fluxo excessivo de elétrons (Fiorentino et al., 2013).

Outro mecanismo pelo qual a hiperglicemia pode induzir a produção de ERO é pela ativação do complexo proteico oxidase de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida (NADPH oxidase). A NADPH oxidase, que é um complexo enzimático encontrado principalmente na membrana de fagossomos, formado basicamente por subunidades transmembrana NOX (gp91^{phox}) e p22^{phox} e subunidades citosólicas (p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}). Algumas isoformas já foram descobertas como a NOX2 (gp91^{phox}), a NOX4, a NOX5, dentre outras, sendo a NOX2 e a NOX4 as mais encontradas no músculo esquelético. Sob circunstâncias normais este complexo é latente, com as subunidades de membrana e citosólicas não acopladas. O complexo é ativado durante o processo conhecido como “explosão respiratória” através da fosforilação da subunidade p47^{phox}, que sofre alteração na sua conformação, permitindo sua interação com a p22^{phox}. Este movimento da p47^{phox} traz consigo a subunidade ativadora p67^{phox}, que em contato com a NOX torna o sistema ativo a reduzir o oxigênio à ânion superóxido (como função primária e não subproduto)

tendo a NADPH como doadora de elétrons (ver revisão de Bedard e Krause, 2007). Foi observado em animais com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica que a produção de ERO foi induzida pela alta glicose disponível para as células musculares esqueléticas, e que esse aumento é em consequência da ativação da NOX2. O processo de hiperglicemia está intimamente relacionado ao aumento da produção de ERO. Ele pode levar ao aumento da produção de Diacilglicerol (DAG) e causar a ativação da NADPH oxidase via Proteína Quinase C (PKC) (Inoguchi et al., 2003). Outras vias de ativação da NADPH oxidase são a do TNF α (proveniente do processo inflamatório), por estímulo mecânico e por isquemia-reperfusão de células vasculares (ver revisão Brandes e Kreuzer, 2005). Além da presença do complexo proteico na membrana de fagossomos, Hidalgo et al. (2006) também reportaram a presença da NADPH oxidase tanto em túbulos transversais intactos quanto em isolados de músculo esquelético de mamíferos.

1.6 EXERCÍCIO RESISTIDO NO PROCESSO DE OBESIDADE E RESISTÊNCIA À INSULINA

Sendo a obesidade uma doença multifatorial, várias abordagens são necessárias para prevenção, controle e tratamento da mesma. Dentre elas, o exercício físico vem sendo reportado como uma dessas abordagens terapêuticas desde de o século 19 até os dias atuais (“Treatment of obesity”, 1889; “Obesity: Its Causes and Treatment. Part II - Treatment”, 1891; Capehorn et al., 2016; Leitner et al., 2017; Haywood e Sumithran, 2019).

Está bem estabelecido que o exercício regular é um método eficaz no tratamento e no controle de doenças metabólicas (Zanuso et al., 2010, 2017; Denham et al., 2016). Os programas de treinamento físico usados para prevenção e/ou tratamento auxiliar de doenças como obesidade e diabetes são relativamente eficazes no que se refere a perda de peso e na melhora da sensibilidade à insulina, como na revisão sistemática apresentado por Way et al. (2016) onde a meta-análise de 16 estudos demonstrou que o exercício regular tem um benefício significativo na sensibilidade da insulina, podendo persistir por 72 horas ou mais após a última sessão de treinamento. Já trabalho de Ohkawara et al. (2007), sugere que o exercício aeróbico é eficaz na redução da gordura abdominal. Inúmeros são os trabalhos encontrados na literatura relacionados à obesidade e os efeitos bioquímicos e

moleculares como consequência de programas de exercícios aeróbicos (Fenster et al., 2002; Okura et al., 2005; Suh et al., 2007; Da Luz et al., 2011; Farias et al., 2012; Farias et al., 2013; Da Silva et al., 2015; Rada et al., 2018).

Na década de 80 Walberg (1989) trouxe um dos primeiros trabalhos relacionados ao exercício resistido e suas implicações para pessoas obesas. Há época, a pesquisa concluiu que este tipo de exercício físico pode ser eficaz para a obesidade, pois seria útil para manter a massa magra livre de gordura, e consequentemente, manter a taxa metabólica de indivíduos em processo de perda de peso. Em outro trabalho de Eriksson et al. (1997) utilizaram o exercício resistido como tratamento para indivíduos portadores de DM2 não dependentes de insulina e concluíram que a modalidade de exercício significativamente melhorou, à longo prazo, o controle glicêmico, porém este não foi associado à perda de peso. Desde então, o exercício físico resistido vem ganhando espaço no tratamento da obesidade e comorbidades associadas (LeBrasseur et al., 2011; Strasser et al., 2012; Di Meo et al., 2017a).

O exercício físico resistido é um tipo de atividade realizado contra uma resistência para induzir ganhos substanciais na força ou massa muscular. Este tipo de abordagem depende principalmente da energia anaeróbica e é importante para estimular o metabolismo energético e da glicose. Codella et al. (2018) mostram que o treinamento resistido pode ser mais eficiente que o exercício aeróbico na melhora do controle glicêmico, e que o primeiro é de suma importância para tratamentos de quadros como o da DM2.

Além da relação que o exercício resistido tem na manutenção e ganho de massa muscular e consequente melhoria do controle glicêmico, benefícios sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, ao processo inflamatório, e ao processo metabólico intracelular também tem grande influência no tratamento da obesidade e comorbidades associadas. A todo modo, parece provável que os efeitos benéficos do exercício na obesidade são, em parte, pela regulação do balanço redox celular em razão do aumento do sistema de defesas antioxidantes, (Vilela et al., 2018) pelo controle do processo inflamatório exacerbado (Leite et al., 2013; Talebi-Garakani e Safarzade, 2013; Mardare et al., 2016; Vilela et al., 2018), e na regulação do metabolismo celular da glicose (Yaspelkis et al., 2002; Krisan et al., 2004; Botezelli et al., 2016).

São emergentes os estudos demonstrando o papel do exercício resistido na obesidade e nas comorbidades como a DMT2 e a resistência à insulina (Irvine e Taylor, 2009; Kelley e Kelley, 2009; Church et al., 2010; Jorge et al., 2011; Bacchi et al., 2012; Banitalebi et al., 2019). Entretanto, o foco da maioria dos estudos ainda está na influência sobre o peso corporal, sobre parâmetros clínicos, e sobre avaliações relacionadas ao tecido adiposo, já que é neste tecido que ocorre o acúmulo excessivo de gordura e o início do processo inflamatório relacionado à doença. Porém, como já relatado, o músculo esquelético desempenha um crucial papel metabólico, sendo um tecido com alto consumo de energia, e o principal utilizador da glicose insulino-dependente para seus processos energéticos. Como a cronicidade da obesidade e da DMT2 está diretamente relacionado a alterações do metabolismo da glicose e à resistência à insulina, é de suma importância o estudo dos efeitos do exercício resistido sobre o tecido muscular esquelético. Vale ressaltar que até o presente momento, os estudos relacionados a este tema não associam, em uma mesma pesquisa, todos os aspectos da doença levantados por este trabalho como: avaliação clínica de peso e resistência à insulina, perfil do tecido adiposo; e avaliação da via de sinalização da insulina, de parâmetros de estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios no tecido muscular esquelético. Estes resultados podem esclarecer os aspectos moleculares do exercício resistido relacionados à obesidade e contribuir tanto para futuras pesquisas acerca do tema, bem como para melhor entendimento acerca do tema frente à prescrição de exercícios.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do treinamento resistido, associado ao consumo de dieta hiperlipídica, sobre a resistência à insulina, parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios no músculo esquelético de camundongos com obesidade induzida por dieta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do treinamento resistido, associado à dieta hiperlipídica, no peso corporal total, no acúmulo de gordura corporal e no perfil histológico do tecido adiposo branco.
- Avaliar os efeitos do treinamento resistido, associado à dieta hiperlipídica, na sensibilidade à insulina e sua relação com a dinâmica de captação de glicose.
- Avaliar os efeitos do treinamento resistido, associado à dieta hiperlipídica, na cascata de sinalização e na expressão gênica de moléculas envolvidas com a captação de glicose, dependentes ou não de sinal insulínico, em tecido muscular esquelético.
- Avaliar os efeitos do treinamento resistido, associado à dieta hiperlipídica, em parâmetros inflamatórios no tecido muscular esquelético.
- Avaliar os efeitos do treinamento resistido, associado à dieta hiperlipídica, em parâmetros de estresse oxidativo no tecido muscular esquelético.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC (protocolo 067/2014-2). Os experimentos deste trabalho foram executados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais só foram submetidos às intervenções recomendadas nos protocolos descritos nesta pesquisa após a aprovação do Comitê de Ética Institucional.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos (60 dias), pesando em média 35,54g ($\pm 3,14$ g) fornecidos pelo Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC (Criciúma/SC – Brasil). Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro 12/12h, a 22^oC e em caixas coletivas (até 7 animais/caixa). Os animais foram divididos em dois grandes grupos: dieta padrão (DP, $n_{\text{inicial}}=11$, duas caixas, uma com 5 e outra com 6 animais) e obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DIO $n_{\text{inicial}}=13$, duas caixas, uma com 7 e outra com 6 animais).

O procedimento de escolha dos animais para compor o grupo DP e DIO foi aleatória, e previamente ao início do protocolo de treinamento os animais foram novamente randomizados, sem haver avaliação de desempenho prévio ou utilizar qualquer outro indicador de permitisse a divisão dos grupos, além da prévia intervenção das dietas (DP ou DIO). Dentro de cada grupo supracitado uma das caixas foi destinada à realização do treinamento físico resistido (R), e a outra continuou somente com a intervenção dietética e foi chamada de grupo não treinado (N), constituindo os seguintes grupos: DP-N ($n=4$); DP+R ($n=6$); DIO-N ($n=6$); DIO+R ($n=6$). Durante o estudo um animal do grupo DP e outro do grupo DIO morreram de forma inesperada. Os diferentes grupos se mantiveram separados ao longo de todo experimento evitando conflito entre os animais e conseqüentemente quadro de estresse, possíveis alterações dos resultados, perdas amostrais, e comprometimento do bem-estar geral.

3.3 DIETA

Os animais receberam ração e água *ad libitum* e foram alimentados durante todo o período do estudo (26 semanas) com dieta comercial padrão (DP) ou com uma dieta hiperlipídica (DIO). A dieta hiperlipídica também se caracteriza como hipercalórica, mas será primariamente chamada de “dieta hiperlipídica” ao longo do estudo por este ser a termo/característica mais relatados na literatura. O protocolo de indução de obesidade foi de 17 semanas (Wang e Liao, 2012), seguidas de mais 9 semanas de dieta associada ao exercício. A DP foi adquirida de Puro Trato Nutrição Animal (cat. Puro Lab 22PB) Santo Augusto, RS, Brasil (calorias provenientes de 50% carboidratos [amido e açúcares], 27% proteínas e 23% lipídeos [gordura animal e óleo de soja], totalizando 3,3 kcal/g). A aquisição da dieta hiperlipídica foi de PragSoluções Biociência (ração hiperlipídica), Jaú, SP, Brasil (calorias provenientes de 26% carboidratos [amido de milho e sacarose], 15% proteínas e 59% lipídeos [óleo de soja e banha], totalizando 5,3 kcal/g).

Após 17 semanas de dieta, foi realizado o teste de tolerância à insulina, iniciado o período de adaptação e início do protocolo de treinamento de acordo com o delineamento do estudo (Figura 4).

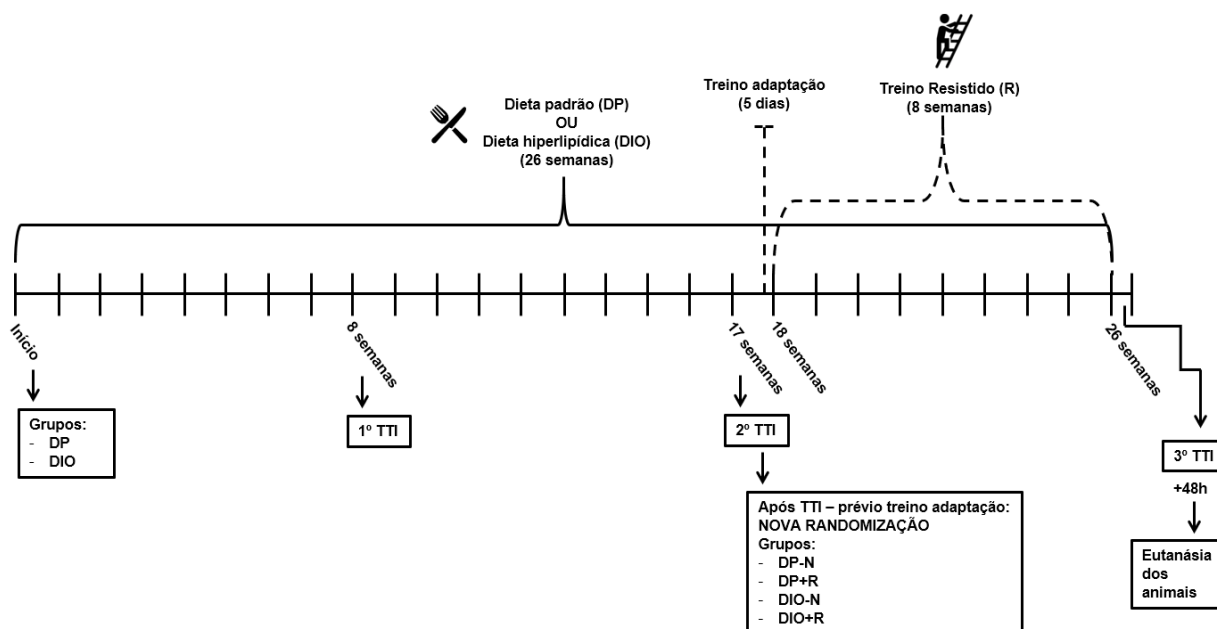


Figura 4: Linha do tempo - desenho experimental do estudo. DP (dieta padrão), DIO (obesidade induzida por dieta), R (treino resistido), TTI (teste de tolerância à insulina). Fonte: dados da autora.

3.4 PESO CORPORAL, ÍNDICE DE ADIPOSIDADE E TESTE DE TOLERÊNCIA À INSULINA (TTI)

O peso corporal dos animais foi mensurado ao início do estudo (caracterizada nos gráficos como semana 0), nas semanas prévias ao treinamento (2^a, 4^a, 8^a, 12^a e 17^a semanas) e durante o período de exercício (18^a, 22^a e 26^a semanas).

Para avaliar o perfil do tecido adiposo branco as gorduras inguinal, epididimal, perirenal, retroperitoneal e mesentérica foram retiradas pós eutanásia e pesadas individualmente para obtenção do índice de adiposidade (*Índice de adiposidade = [Soma das gorduras/peso corporal total]*100*).

O TTI foi realizado inicialmente na semana 8. O sangue foi coletado através de uma pequena incisão na ponta da cauda dos animais com jejum prévio de 6 horas (Ayala et al., 2010), e a concentração de glicose sanguínea foi mensurada através de um glicosímetro para determinação da glicemia de jejum. Feito isso, todos os animais receberam uma dose de 2U/kg de insulina intraperitoneal e subsequentes mensurações da glicose sanguínea nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30min foram realizadas (tempo pós-insulina) (adaptado de Wang e Liao, 2012). Os animais que apresentaram valores de glicose abaixo de 30mg/dL durante o teste foram mantidos aquecidos e receberam glicose intraperitoneal. O mesmo protocolo de TTI foi realizado ao final do período de treinamento (pós-exercício, semana 26) 48h após a última sessão de exercício. Para demonstração e análise dos dados os mesmos foram expostos como dados absolutos de glicose (mg/dL), como área sob a curva do TTI calculado com cruzamento dos dados de glicose (mg/dL) ao longo do tempo pós-injeção de insulina (0 a 30min), e através da taxa de decaimento da glicose plasmática (kTTI %/min). Este último dado representa a porcentagem de decaimento dos níveis de glicose sanguínea por minuto e foi determinada através da razão $0,693/t_{1/2}$, onde o denominador representa 50% da taxa de decaimento da glicose. O valor de $t_{1/2}$ foi calculado através da fórmula $t_{1/2} = t * \ln(2)/\ln(N_0/N_t)$ utilizando os valores de glicose entre o tempo 5min (início do declínio linear) e o tempo onde a mesma caía a um certo valor equivalente à metade do valor inicial (Lundbaek, 1962; Dube et al., 2013). \ln representa o logaritmo natural, t o tempo passado, N_0 a quantidade da glicose inicial, e N_t a quantidade de glicose depois do período de tempo.

3.5 TREINAMENTO

O treinamento resistido foi realizado no período vespertino, entre 17:00h (5:00pm) e 17:30h (5:30pm), em um aparato de escada de 1m com degraus de 2cm de distância e inclinação de 85° (adaptado de Hornberger e Farrar, 2004). Após 17 semanas de dieta, como previamente descrito, os grupos destinados à realização do exercício iniciaram o período de adaptação. Para tal, os animais foram familiarizados com o exercício de subida nos degraus por 5 dias consecutivos, 1 sessão por dia, 1 subida por sessão (sem carga). A sessão era considerada satisfatória quando o animal completava a subida do início ao final da escada. O protocolo de treinamento (adaptado de Scheffer *et al.*, 2012; Vilela *et al.*, 2018), teve início 3 dias após o último treino de adaptação e foi realizado com intervalo de 48h entre as sessões, por 8 semanas, totalizando 28 treinos. O exercício foi realizado com progressão de intensidade acoplado um peso à cauda do animal (incremento de carga de 20% a 75% do peso corporal), e progressão de volume (5-10 séries por sessão) (Tabela 3), com intervalo de 2 min entre as séries, permitindo ao animal descansar na área de descanso (caixa fechada no topo dos degraus medindo 20x20x20cm). Cada série foi realizada até que os animais completassem 5 repetições/escaladas (sem intervalo), ou não conseguissem mais subir as escadas mesmo após incentivo (estímulo manual na base da cauda).

Tabela 3: Protocolo de Treinamento Resistido

Semanas	Carga	Séries	Intervalo entre séries
1^a	20%	5	1 (2min)
2^a	20%	7	1 (2min)
3^a	50%	5	1 (2min)
4^a	50%	7	1 (2min)
5^a	50%	10	1 (2min)
6^a	50%	10	1 (2min)
7^a	75%	7	1 (2min)
8^a	75%	10	1 (2min)

Fonte: dados da pesquisa. Adaptado de Scheffer et al. (2012)

3.6 EUTANÁSIA

Após 48 horas ao último Teste de Tolerância à Insulina (TTI) foi realizada a eutanásia por decapitação. Posteriormente os músculos quadríceps (porção central vermelha), gastrocnêmio (porção central vermelha), tecido adiposo branco (inguinal, epididimal, perirenal, retroperitoneal e mesentérico) foram extraídos, lavados em salina 0,9%, secados em papel filtro e foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80° para posteriores análises, exceto uma porção do quadríceps e do tecido adiposo inguinal que foram embebidos em formol 4% e destinado à histologia.

3.7 WESTERN BLOT

Após coleta, o gastrocnêmio (~50mg) foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, armazenado em -80° . Posteriormente foi homogeneizado em tampão de lise (135mM NaCl, 1mM MgCl₂, 2.7mM KCl, 20mM Tris base [pH 8], 1% Triton, 10% Glicerol, 10.27mM Na₃VO₃, 3.5mM PMSF, 1 μ M aprotinina, 10mM Na₄P₂O₇). O lisado foi centrifugado por 15min (4° C) a 12000 rpm. Uma alíquota do sobrenadante de cada amostra foi utilizada para determinar a concentração de proteína pelo método Bradford (Bradford, 1976). O restante do sobrenadante foi diluído 1:1 em Laemmli Sample Buffer 2x (Biorad cat.1610737), aquecido em banho maria a 95° C por 5 min e imediatamente resfriado em gelo e armazenado em -20° C. Para a técnica de eletroforese, foram pipetadas 60 μ g de proteína em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). A corrida foi realizada a 60V por 30 min e 110V por aproximadamente 2h em tampão de corrida (Tris base 25mM, glicina 192mM e SDS 3.4mM). Para comparação de alturas moleculares, foi utilizado um peso molecular de proteínas coradas (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad cat.1610374). Posteriormente, a transferência das amostras foi feita do gel para membrana de Difluoreto de Polivinilideno (PVDF) (BioRad cat.1620177), em tampão de transferência (Tris base 25mM, glicina 192mM, 20% metanol [CH₃OH]) a 120V por 2h, resfriado constantemente em gelo. O bloqueio de ligações inespecíficas das membranas foi realizado com tampão bloqueio (Albumina bovina - BSA 3% diluído em tampão de lavagem). Para o processo de revelação, as membranas eram incubadas com anticorpos primários a 4° C overnight em agitação e posteriormente lavadas com

tampão de lavagem (Tris base 50mM, NaCl 15mM, Nonidep P-40 500µL e Tween-20 500µL) 3 vezes de 5 min. Após, eram incubadas com anticorpo secundário (com peroxidase conjugada) por 1h em temperatura ambiente e agitação, e novamente lavadas. As membranas eram então incubadas com reagente contendo peroxidase quimioluminescente (Clarity Western ECL Substrate, BioRad cat.170-5061), e então expostas a filme de raio-x. Foram analisados o conteúdo das proteínas: Akt1/2/3 total (62kDa - Abcam cat126811), phospho-Akt (S473 - 60kDa - Santa Cruz cat.7985-R), GSK-3β total (46 kDa – Santa Cruz cat.sc-9166), phospho-GSK-3β (S9 – 46 kDa - Invitrogen cat.MA5-14873), AMPKα total (63kDa – Santa Cruz cat.74461), phospho-AMPKα (Thr172) (63kDa – Santa Cruz cat.33524), GAPDH (36kDa – Invitrogen cat.PA1-987). As bandas foram escaneadas e a densitometria de banda foi mensurada pelo programa ScionImage. Os valores foram obtidos dividindo os valores da proteína de interesse pelos valores da proteína endógena (GAPDH). Já os valores das proteínas fosforiladas foram normalizados pelo valor de suas proteínas totais após estas serem normalizadas pelo controle endógeno. Valores expressos em unidades arbitrárias (U.A.).

3.8 EXTRAÇÃO RNA E EXPRESSÃO GÊNICA – REAL-TIME RT-QPCR

A análise molecular da expressão gênica foi realizada de acordo com *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) Guidelines for RT-qPCR experiments* (Bustin et al., 2009, 2013). O RNA total foi isolado do músculo gastrocnêmio utilizando o reagente TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza (Abs 260/280nm ~2.0) e a concentração do RNA foi determinada utilizando NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) e posteriormente tratado com Deoxyribonuclease I – Amplification Grade (Sigma-Aldrich Inc, St Louis, Missouri, USA), para eliminar a contaminação de DNA genômico, de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™) a partir de 2µg de RNA total, de acordo com as instruções do fabricante. O PCR quantitativo foi realizado utilizando a sonda SYBR® Green I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) para detectar a síntese de cDNA de cadeia dupla no sistema 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). As

condições de ciclagem do PCR foram: uma etapa inicial de ativação da polimerase de 5min a 95°C, 40 ciclos de 15seg a 95°C para desnaturação, 35seg a 60°C para anelamento e 15seg a 72°C para alongamento. Ao final do protocolo de ciclagem, uma análise da curva melting foi incluída e fluorescência medida de 60 a 99°C para confirmar a especificidade do primers e a ausência de dímeros de primers. Todos os ensaios para PCR tempo real foram realizados com quadruplicatas e, em todos os casos, um controle negativo de transcriptase reversa foi incluído em cada reação de PCR substituindo as amostras por água destilada livre de DNase/RNase. O gene *Ppia* (Peptidilprolil Isomerase A) (Nishimura et al., 2008; Tatsumi et al., 2008; Pernot et al., 2010) foi utilizado como gene referência para normalização. A eficiência por amostra foi calculada utilizando o software LinRegPCR 2018.0 (<http://LinRegPCR.nl>). A expressão relativa do mRNA foi determinado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Pfaffl, 2001; Bustin et al., 2013) e os resultados apresentados como razão/vezes em relação ao grupo DP-N (dieta padrão não treinado). A sequência dos primers *reverse* e *forward* está representado na Tabela 4.

Tabela 4: Desenho Primers – Real Time PCR

Nome do Oligo	Gene Bank		Sequência (5'→3')	Posição no DNA	Referência
<i>Ppia</i>	NM_008907	Foward	TATCTGCACTGCCAAGACTGAATG	381-404	Pernot et al., 2010
		Reverse	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	507-485	
<i>gp91^{phox}</i>	NM_007807.5	Foward	CCAAAACCATTCCGAGGTCTTATTT	655-679	Dados da autora
		Reverse	TGGTACTGGGCACTCCTTTATTT	854-832	
<i>Nox 4</i>	NM_015760.5	Foward	CCGGGATTTGCTACTGCCTCCATC	1340-1363	Dados da autora
		Reverse	ACTCCAATGCCTCCAGCCACAC	1501-1480	
<i>p22^{phox}</i>	NM_001301284.1	Foward	GCAGAGGTCCGAAAGAAGCCGA	470-491	Dados da autora
		Reverse	ACAGCCACTGAAGGTCACACGA	582-561	
<i>Rac1</i>	NM_009007.2	Foward	CCATCAAGTGTGTGGTGGTGGGA	204-226	Dados da autora
		Reverse	AACACGTCTGTCTGCGGGTAGG	429-408	
<i>p47^{phox}</i>	NM_001286037.1	Foward	CGCAGGTGAACCGTATGTAA	736-755	Dados da autora
		Reverse	CAGGAGCTTATGAATGACCTCAA	838-816	
<i>p67^{phox}</i>	NM_010877.5	Foward	CATGCCTGGGAACATCGTCTTT	1919-1940	Dados da autora
		Reverse	GGGTGAATCCGAAAGCTCAACTG	2044-2023	
<i>JNK1 (MAPK8)</i>	NM_016700.4	Foward	TCCCAGCTGACTCAGAGCAT	1030-1049	Huang et al., 2016
		Reverse	GCTTCATCTACGGAGATCCTT	1135-1115	
<i>ERK1 (MAPK1)</i>	NM_011949.3	Foward	CGCTTCAGACATGAGAACATC	468-488	Huang et al., 2016
		Reverse	GGTCCGTCTCCATGAGGT	573-556	
<i>AMPKα2</i>	NM_178143.2	Foward	CATGGCTGAGAAGCAGAAGCAC	100-121	Fu et al., 2013
		Reverse	CTTAAGTCCACTTTATGGCCTG	235-213	
<i>CaMKK2β</i>	NM_001199676.1	Foward	CCAGGATTGTGGTGCCTGAAATC	1515-1537	Fu et al., 2016
		Reverse	ATTCTCGACCTCCTCTTCGGTCA	1636-1614	

Fonte: dados da autora.

3.9 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Cortes transversais do músculo quadríceps e do tecido adiposo branco inguinal foram seccionados e imediatamente imersos em solução fixadora de paraformoldeído 4% (PFA) e tamponados por 48h para posterior processamento histológico. O material foi incluído em parafina e cortado em micrótomo obtendo-se cortes de 5 μ m de espessura. As lâminas foram coradas com coloração de hematoxilina & eosina (H &

E) para aquisição das imagens e análise histopatológica da histoarquitetura muscular e do tecido adiposo. Foi utilizado um microscópio invertido Nixon para aquisição e análise das imagens.

3.10 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para os ensaios bioquímicos descritos a seguir, as amostras foram homogeneizadas em tampão específico para cada ensaio. Em todos, o homogeneizado foi centrifugado por 10min a 4°C e o sobrenadante foi estocado à -80°C. Os níveis de proteína foram determinados em todas as amostras utilizando o método Bradford (Bradford, 1976), baseado na absorbância (595nm) da alteração da coloração do corante Coomassie brilliant blue G-250, o qual tem sua coloração vermelha convertida em azul quando em ligação com a proteína da amostra. Os padrões para a técnica de Bradford foram obtidos pela diluição de um estoque de albumina bovina sérica (Sigma-Aldrich cat. A2153). Para determinar a concentração proteica de cada amostra foi utilizado o cálculo de regressão linear baseado em uma curva padrão de albumina de soro bovina que variou de 2 ug/mL a 12 ug/mL.

3.10.1 Oxidação de diclorodihidrofluoresceína (DCFH)

Os níveis de espécies reativas foram mensurados no músculo quadríceps com base na oxidação da sonda 2',7'- diclorodihidrofluoresceína acetato (DCFH-DA) em um composto fluorescente 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (DCF), como previamente descrito (Dong et al., 2010). Uma alíquota do tecido (~50mg) foi homogeneizada em tampão PBS (fosfato-salino) 50mM, com adição de 10uM de aprotinina. Uma alíquota do lisado foi incubada com DCFH-DA 80 mM a 37°C durante 15 minutos. A DCFH-DA é desesterificada no interior das células por esterases endógenas para o ácido livre ionizado, DCFH. DCFH é oxidado em DCF por espécies reativas, principalmente por peróxido de hidrogênio. A formação deste derivado oxidado fluorescente foi monitorada com os comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente. A produção de espécies reativas foi quantificada utilizando uma curva padrão de DCF que variou de 0 a 1000 nM e os dados foram expressos como mol DCF/mg de proteína.

3.10.2 Carbonilação de proteínas

Método utilizado para dosagem de oxidação de proteínas baseia-se no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNTP). O conteúdo de carbonil é determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente 22.000 Molar⁻¹ em nmol/mg de proteínas, como descrito por (Levine et al., 1990).

Para preparação da amostra, alíquotas do músculo quadríceps foram homogeneizadas em tampão 120mM de cloreto de potássio (KCl) e 30mM de fosfato monopotássico (KH₂PO₄), centrifugadas por 15min a 4^oC, 14000rpm, e separado o sobrenadante. Foram utilizadas alíquotas contendo 500ug de proteína. Inicialmente foi adicionada à cada amostra 100uL de solução 20% de ácido tricloroacético (TCA), e as mesmas foram centrifugadas por 5min a 700rpm, descartado o sobrenadante e ressuspendido o pellet em 100uL de 0,2M de hidróxido de sódio (NaOH). Para iniciar a técnica, a amostra foi diluída 3x em DNTP 10mM diluído em ácido clorídrico (HCl) 2M. O HCl 2M foi utilizado como branco. Após incubação em temperatura ambiente por 1 hora, foi adicionado novamente 100uL de TCA 20%, centrifugado por 14000rpm por 3 min, e descartado o sobrenadante. O pellet foi então lavado e ressuspendido 3x com etanol-etilacetado (com centrifugação de 3 min, 14000rpm entre as lavagens). Após a última lavagem, o pellet foi ressuspendido em 1mL de guanidina 6M (diluída em tampão 20mM KH₂PO₄, pH ajustado para 2,3 com ácido trifluoroacético), e a amostra foi incubada a 60^oC em banho maria por 30 min, com auxílio do vórtex para diluição completa. Ao final, a amostra foi novamente centrifugada por 3 min a 4^oC, 14000rpm para remover qualquer material insolúvel, e então lida em cubeta de quartzo, em espectrofotômetro à 370nm (UV).

3.10.3 Atividade de enzimas antioxidantes

Para análise da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) uma alíquota das amostras de do músculo quadríceps foi homogeneizada em tampão fosfato 50mM e centrifugada (3000 x g) por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio. A atividade da SOD foi estimada através da inibição da auto oxidação da adrenalina e lida espectrofotometricamente a 480 nm de acordo com o método descrito

por (McCord e Fridovich, 1969). A atividade da catalase (CAT) foi determinada, no mesmo tecido, com base na taxa de decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerada pela enzima presente na amostra usando uma solução H_2O_2 em 10mM em tampão fosfato de potássio, pH 7.0. A taxa máxima de decomposição H_2O_2 foi medida em espectrofotômetro em 240nm (Aebi, 1984). Os valores foram expressos como unidades de SOD ou CAT por mg de proteína.

3.10.4 Níveis de glutathiona

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) e a razão entre GSH e GSSG foram determinados conforme Rahman et al. (2006). O nível de glutathiona total é determinado numa reação da GSH com o ácido 2-nitrobenzóico (5,5'-Dithiobis) (DTNB) produzindo um ducto de glutathiona-TNB oxidado (GS-TNB). A taxa de formação de TNB é proporcional a concentração de GSH na amostra. O produto dissulfeto (GS-TNB) é então reduzido pela glutathiona redutase (GR) na presença de NADPH, reciclando GSH. A quantidade de glutathiona mensurada representa a soma da glutathiona oxidada e reduzida na amostra ($[GSH]_{total} = [GSH] + 2x[GSSG]$). A taxa de variação da absorbância ($DA\ 412\ nm\ min^{-1}$) é feita para ser linear à conveniência e consistência da medição, e é linearmente proporcional ao total da concentração de GSH. A concentração de uma amostra desconhecida é determinada pelo cálculo a partir da equação linear ou da curva de regressão gerada a partir de vários padrões de GSH. Já no ensaio da GSSG o método de reciclagem da GSSG redutase é usado para determinação da GSSG pelo monitoramento nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) espectrofotometricamente pelo método de Griffith's. Os estratos celulares são tratados com 2-vinilpiridina, que reage covalentemente com GSH (mas não GSSG). O excesso de 2-vinilpiridina é neutralizado com trietanolamina. Os dados foram expressos em concentração de GSSG em nM/mg de proteína.

3.10.5 Lipoperoxidação

As concentrações de malondialdeído (MDA) nas amostras de músculo quadríceps foram determinados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Agilent Technologies 1200 Series; Santa Clara, CA, EUA) de acordo com (Grotto et al., 2007), utilizando uma derivação de ácido tiobarbitúrico (TBA). Uma curva padrão

foi preparada utilizando sal de tetrabutilamônio de malondialdeído em concentrações que variam de 0.5 a 5 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de MDA/mg de proteína.

3.11 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

As concentrações do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α – Invitrogen cat.88-7340) e da interleucina 1 beta (IL1 β – Invitrogen cat.88-7013) foram avaliadas no músculo quadríceps por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante. Em ambos os protocolos, as placas foram inicialmente incubadas *overnight* a 4°C com 100uL de *Coating Buffer*. No dia seguinte, foram lavadas três vezes com 250uL de *Wash Buffer* e então incubadas (bloqueio) com 200uL do diluente *ELISASPOT (1X)* por 1h em temperatura ambiente. Após, os poços foram lavados uma vez com *Wash Buffer* e então foram pipetas os 100uL da solução padrão (diluição seriada para curva padrão) e 100uL das amostras nos respectivos poços. As placas foram então incubadas por 2h em temperatura ambiente, então lavadas com *Wash Buffer* 4 vezes e foi então adicionado 100uL do anticorpo de detecção e incubadas por 1h em temperatura ambiente. Após, o processo de lavagem foi novamente repetido por 5 vezes, e foi então adicionado 100uL de Avidina/HRP a cada poço, e incubado por mais 30min em temperatura ambiente. O processo de lavagem por repetido e então foi adicionado 100uL de solução TMB, incubado por mais 15min em temperatura ambiente, e então acrescentado 50uL de *Stop Solution*. As placas foram então lidas por espectrofotômetro a 450nm. As concentrações foram calculadas por Regressão de Quatro Parâmetros Logísticos (4PL) (Xiang et al., 2018) através do site <https://www.myassays.com>. Resultados expressos em pg/mg de proteína.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados de peso corporal total ao longo das semanas do estudo foi realizada através da análise de variância ANOVA duas vias de medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. Para os dados do teste de tolerância à insulina (TTI) da oitava semana foi utilizado o teste-t de Student para comparações entre variáveis não pareadas. Para todas as outras análises realizadas

dentro do período definido como pós-exercício (após randomização e início do protocolo de treinamento) foi realizada análise de variância ANOVA duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. Para as análises de PCR foi realizado o cálculo de razão sobre valor basal e realizado teste-t de Student para amostras não pareadas. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o Graph Pad Prism versão 5 como pacote estatístico. Os dados relacionados à padrões clínicos como peso corporal total, diâmetro do adipócito, índice de adiposidade, peso do tecido adiposo branco, dosagens de glicose no teste de tolerância à insulina, glicemia de jejum e valores glicêmicos absolutos foram expressos como média \pm desvio padrão. Os demais dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DO PROTOCOLO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA NO PESO CORPORAL E RESISTÊNCIA À INSULINA (PRÉ-RANDOMIZAÇÃO)

Com o intuito de desenvolver um quadro de obesidade com ganho de peso e resistência à insulina (RI) o grupo intitulado DIO foi alimentado com dieta hiperlipídica por 17 semanas, tendo como controle o grupo de mesma idade alimentado com dieta padrão (DP). Durante este período o grupo DIO teve um aumento de peso de 47% em 17 semanas de dieta hiperlipídica, frente a somente 16% de ganho do grupo DP. Em valores absolutos, o grupo DIO iniciou o estudo com média de 35,6g (\pm 2,1) e apresentou média de 52,4g (\pm 4,6) na semana 17 (ganho de 16,8g [\pm 2,6] - $p < 0,001$). Já o grupo DP iniciou o estudo com média de 35,8g (\pm 2,1) e apresentou média de 41,4g (\pm 2,7) na semana 17, com um ganho de somente 5,6g (\pm 1,9 - $p < 0,05$). Comparando os pesos finais dos grupos DIO e DP na semana 17, o grupo DIO apresentou 11g a mais que o grupo DP, perfazendo uma diferença de 27% entre os grupos ($p < 0,001$) (Figura 5A – Figura 5B [semanas 0-17]).

Para verificar uma possível alteração na dinâmica da captação da glicose frente ao estímulo da insulina, foi realizado o TTI. O primeiro teste foi realizado na oitava semana para acompanhamento do quadro. Como pode ser verificado na Figura 6, não ocorreram diferenças significativas na curva glicose após TTI (Figura 6A), nem na glicemia de jejum (Figura 6B). O TTI foi novamente realizado ao final do protocolo de indução de obesidade (semana 17) e o grupo DIO apresentou um déficit na dinâmica da captação da glicose após o estímulo exógeno de insulina em comparação ao grupo DP. Este dado pode ser visualizado na curva de glicose (Figura 6C), glicemia de jejum ($p < 0,001$ - Figura 6D), na área sob a curva do TTI ($p < 0,001$ - Figura 6E) e na curva de decaimento da glicose ($p < 0,001$ - kTTI – Figura 6F). As diferenças significativas da Figura 6C podem ser observados nos valores absolutos de glicose apresentados na Tabela 5. Durante o teste, a glicose sanguínea do grupo DIO declinou de 100% (0min) para $99 \pm 13\%$ (5min), $71 \pm 5,7\%$ (10min), $66 \pm 3\%$ (15min), $60 \pm 4,7\%$ (20min), $57 \pm 2,5\%$ (25min) e $56 \pm 2,9\%$ (30min). Já no grupo DP o declínio foi de 100% (0min) para $93 \pm 13,7\%$ (5min), $67 \pm 14,2\%$ (10min), $59 \pm 8,3\%$ (15min), $49 \pm 7,9\%$ (20min), $41 \pm 10\%$ (25min) e $32 \pm 11,2\%$ (30min).

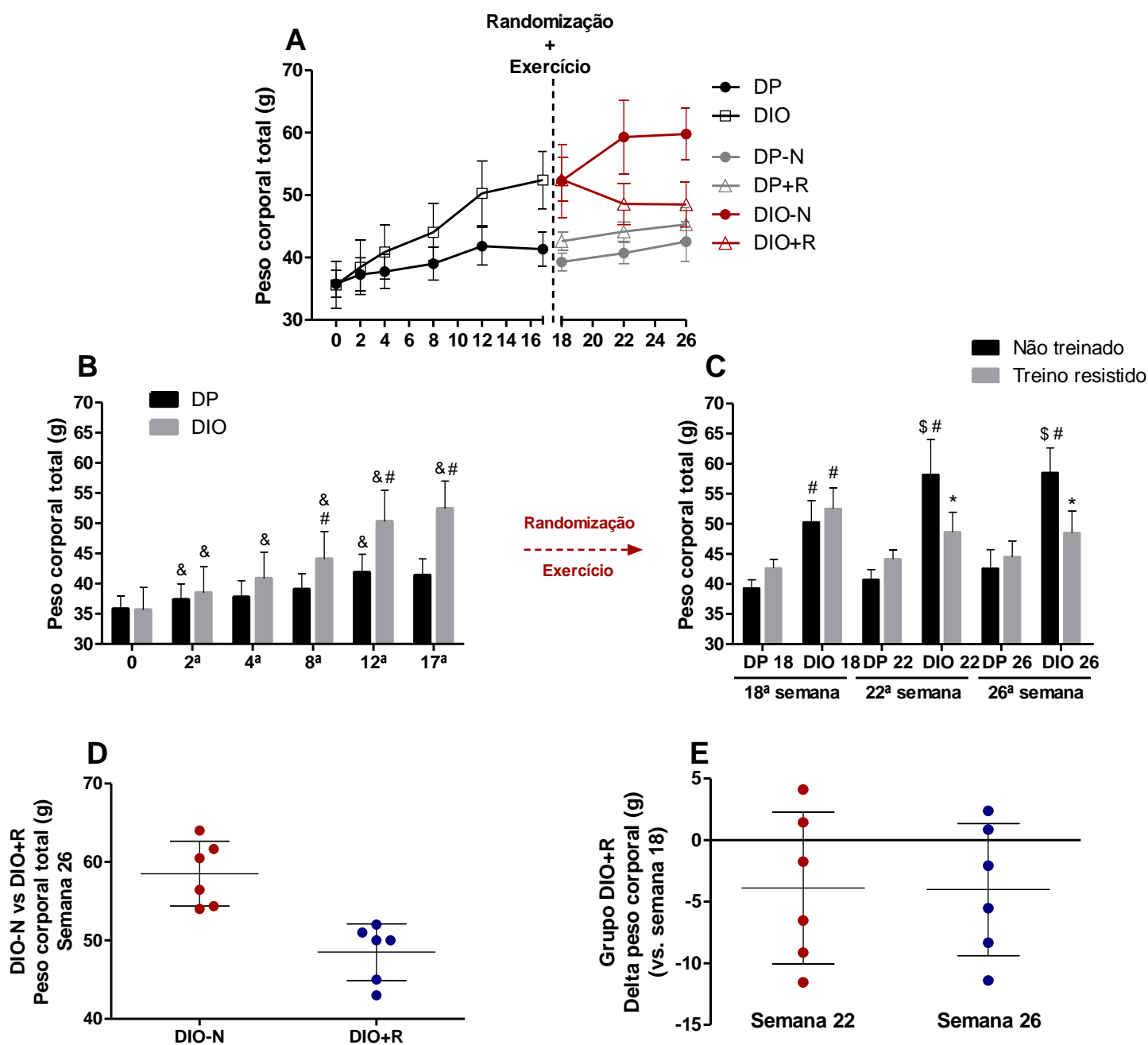


Figura 5: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica no peso corporal total. Peso corporal total (A) mensurado ao longo das semanas de intervenção dietética (pré-randomização – semanas 0, 2, 4, 8, 12, 17) (B), ou ao longo da intervenção dietética associada ou não ao exercício (semanas 18, 22 e 26) (C). Peso final grupo DIO-N vs DIO+R (D). Delta do peso corporal do grupo DIO treino resistido (DIO+R) das semanas 22 e 26 versus a semana 18 (prévia ao início do exercício) (E). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Realizada análise de variância ANOVA duas vias de medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. DP (dieta padrão); DIO (obesidade induzida por dieta). DP-N (DP não treinado); DP+R (DP + treino resistido); DIO-N (DIO não treinado); DIO+R (DIO + treino resistido). * $p < 0,05$ versus respectivo grupo não treinado; # $p < 0,05$ versus respectivo grupo dieta padrão; & $p < 0,05$ versus respectivo grupo semana anterior; \$ $p < 0,05$ versus respectivo grupo 18ª semana pós-randomização.

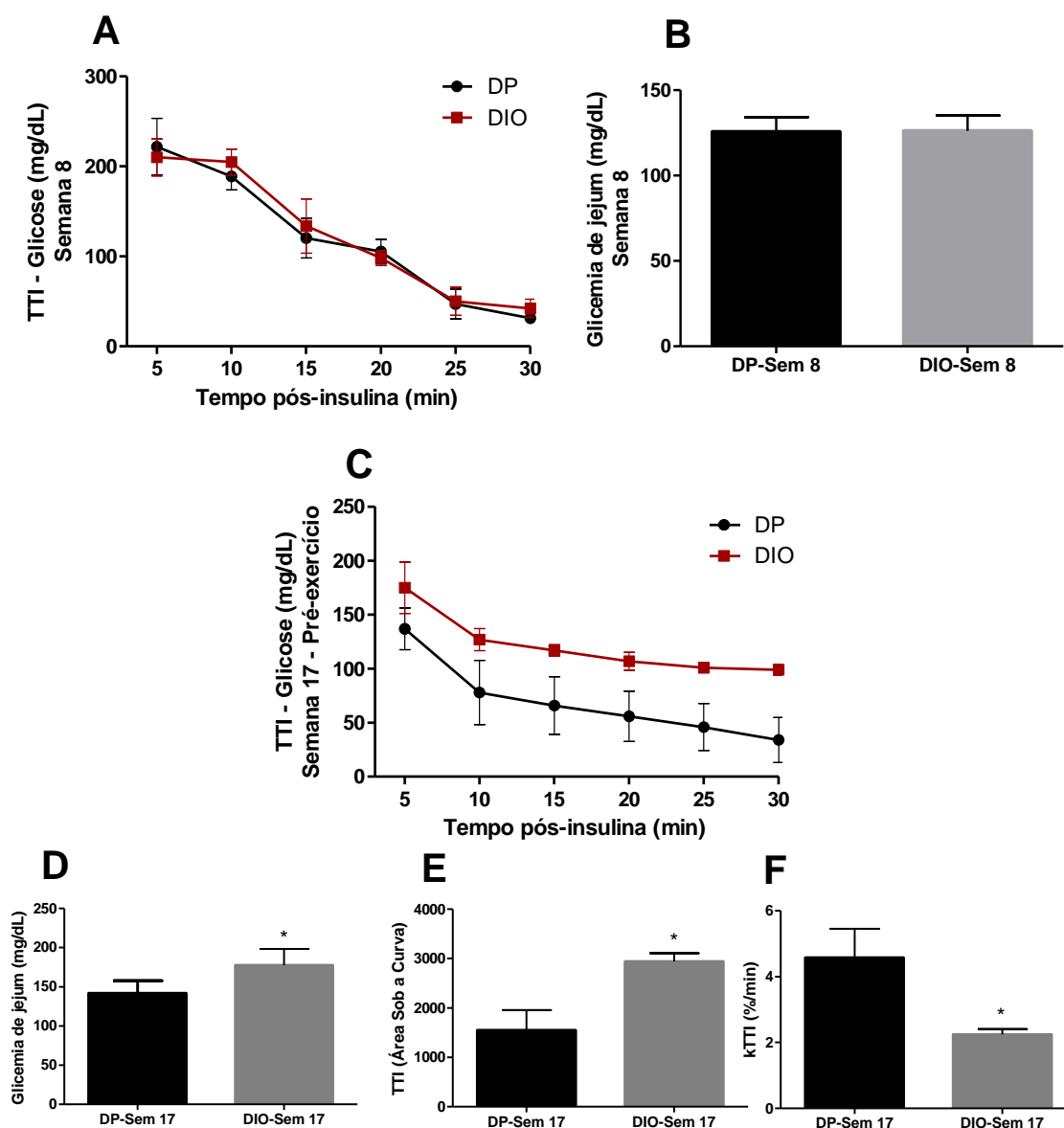


Figura 6: Efeitos do protocolo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica na resistência à insulina. Teste de tolerância à insulina (TTI) realizado na oitava e na décima sétima semana de intervenção dietética. Curva glicêmica do TTI (**A e C**) e glicemia de jejum (**B e D**) na oitava e na décima sétima semana, respectivamente. Área sob a curva (**E**) e constante de decaimento da glicose (%/min) (**F**) referente à curva de glicose do TTI da décima sétima semana. Dados expressos em média \pm desvio padrão. DP (dieta padrão); DIO (obesidade induzida por dieta). Realizado teste-t de Student para comparações entre variáveis não pareadas. * $p < 0,05$ versus DP.

4.2 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, NO PESO CORPORAL E NO PERFIL TECIDO ADIPOSEO BRANCO

O peso corporal foi avaliado no início da semana 18 (prévio ao início do treino de adaptação), no início da semana 22 e no final da semana 26 (após o término do protocolo do treinamento). Durante este período o grupo DIO-N continuou a ganhar peso (semana 18: 50,3g [\pm 3,6] versus semana 26: 60,6g [\pm 3,2] - $p < 0,01$) (Figura 5A e 5C). Já no grupo DIO+R o exercício físico resistido interrompeu a progressão do peso corporal, apresentando, ao contrário, uma redução não significativa de 7,6 % (semana 18: 52,5g [\pm 3,5] versus semana 26: 48,5g [\pm 3,6]) (Figura 5A e 5C). Considerando o delta individual do peso das semanas 22 e 26 em relação a semana 18 (Figura 5E) fica evidenciado que dos 6 animais do grupo, 4 deles perderam peso em relação ao início do exercício e somente dois apresentaram deltas positivos em relação ao início do protocolo de treinamento.

O grupo DIO+R também demonstrou um menor peso corporal quando comparado com seu controle de dieta (DIO-N - $p < 0,01$) (Figura 5A, 5C E 5D). Vale ressaltar que não houve diferença entre o grupo DIO+R e o DP+R, sugerindo que o exercício resistido foi capaz de reduzir o ganho de peso próximo à valores basais de dieta padrão concomitante à realização do exercício resistido.

O consumo de dieta hiperlipídica (grupo DIO-N) levou ao aumento do índice de adiposidade em 3,5 vezes em relação do grupo DP-N (Figura 7A - $p < 0,001$) e também influenciou no aumento do peso individual de todas gorduras avaliadas (Figura 7B). A realização do exercício (DIO+R) não foi capaz de reduzir significativamente o índice de adiposidade (redução de apenas 1,45 vezes) (Figura 7A), e nem os valores médios individuais das gorduras (Figura 7B).

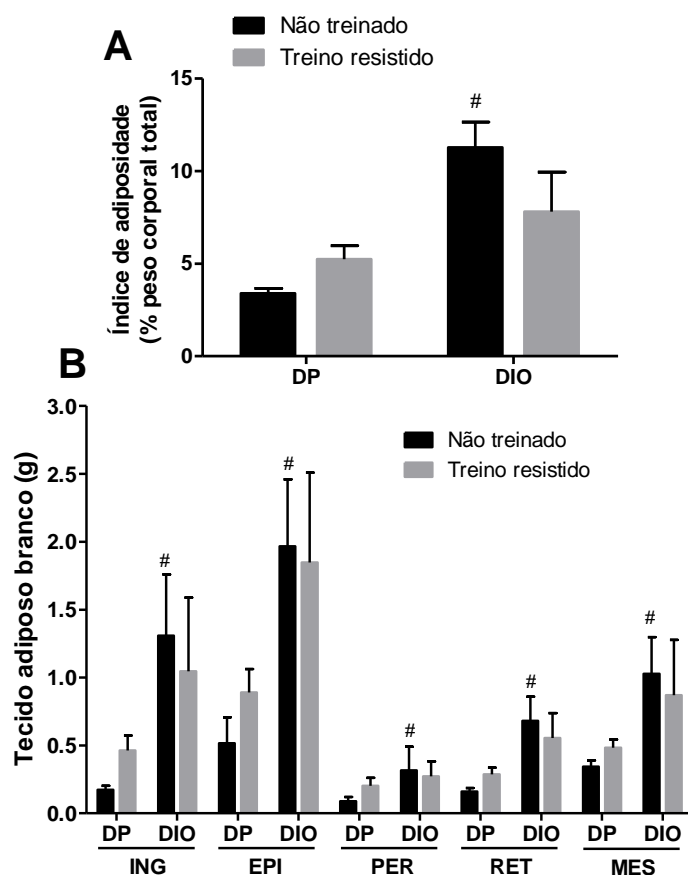


Figura 7: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica no perfil do tecido adiposo branco. Índice de adiposidade (percentual do peso das gordura dividido pelo peso corporal total) **(A)**. Peso em gramas do tecido adiposo branco ING - inguinal, EPI - epididimal, PER – perirenal, RET – retroperitoneal e MES – mesentérico) **(B)**. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Realizada análise de variância ANOVA duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. DP (dieta padrão); DIO (obesidade induzida por dieta); * $p < 0,05$ versus respectivo grupo não treinado; # $p < 0,05$ versus respectivo grupo dieta padrão.

Além do índice de adiposidade e do acúmulo local de gordura corporal, outro fator que tem relação direta com a obesidade e com a resistência à insulina é o tamanho da célula do tecido adiposo. Para tal avaliação foram realizados cortes histológicos do tecido adiposo branco inguinal e avaliado o diâmetro do adipócito. Na Figura 8A (DP-N) e Figura 8B (DP+R) as imagens apresentam morfologia das células adiposas de aspecto normal e diâmetros normais, evidenciadas pelas setas pretas. Nas imagens da Figura 8C (DIO-N) observa-se células adiposas com diâmetro aumentado e membrana envoltória espessada evidenciado pela seta preta. Já nas imagens da Figura 8D (DIO+R), as imagens já demonstram células adiposas com diâmetro menores em comparação ao grupo DIO-N, compatível com aspecto normal, evidenciado pela seta preta.

Para quantificar as análises histológicas demonstradas acima, foi realizada a análise do tamanho da célula (Figura 8E). Observa-se que a média do diâmetro das células no grupo DIO-N ($196,8\mu\text{m} [\pm 34,7]$) foi significativamente superior em relação do grupo DP-N ($84,2\mu\text{M} [\pm 12,5]$), e o exercício foi capaz de reduzir significativamente este aumento (DIO+R – $108,3\mu\text{m} [\pm 27,7]$) mesmo frente à ingesta de alimentação hiperlipídica. Esta redução do diâmetro dos adipócitos no grupo DIO+R foi similar aos valores do grupo DP+R ($114,6\mu\text{M} [\pm 11,1]$).

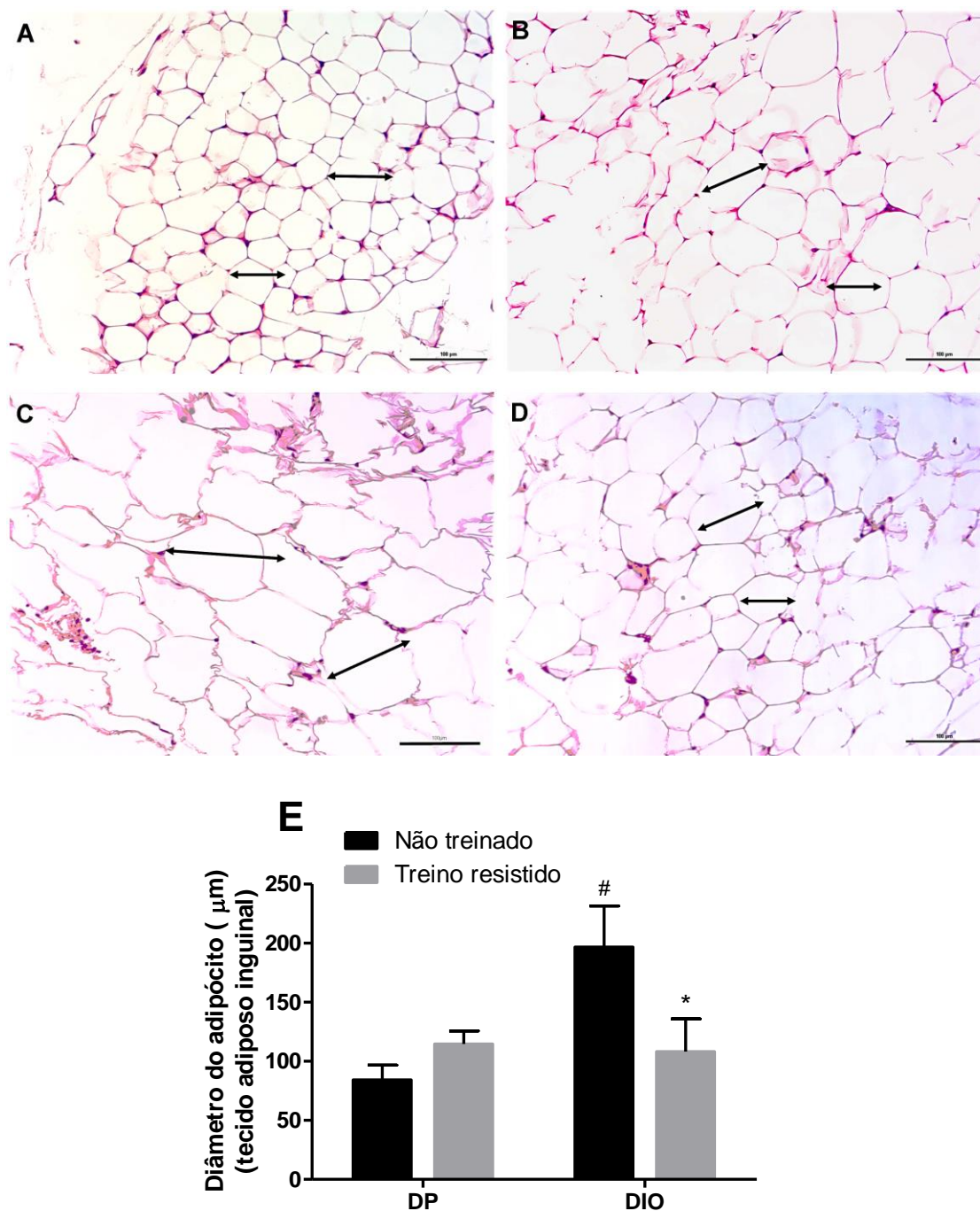


Figura 8: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica no perfil histológico do tecido adiposo branco. Imagens representativas de fotomicrografias histológicas do tecido adiposo branco inguinal nos grupos treinados com exercício resistido, associado ou não à dieta hiperlipídica onde: DP-N (dieta padrão não treinado) (A), DP+R (DP+treino resistido) (B), DIO-N (obesidade induzida por dieta não treinado) (C) DIO+R (DIO+ treino resistido) (D). Quantificação do diâmetro do adipócito do tecido adiposo branco inguinal em μm (E). Aquisição das imagens em microscópio óptico. (n=3. Imagens capturadas em objetiva de 20x-aumento de 200x). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Realizada análise de variância ANOVA duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. * $p < 0,05$ versus respectivo grupo não treinado; # $p < 0,05$ versus respectivo grupo dieta padrão.

4.3 EFEITO DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA NO PERFIL HISTOLÓGICO DO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

Após ingestão de dieta hiperlipídica por 26 semanas, foi avaliado o perfil histológico do tecido muscular em cortes histológicos transversais da porção central vermelha do quadríceps. Avaliando o grupo DP-N, pode se observar na Figura 9A que a morfologia das fibras musculares apresenta aspecto normal com o núcleo periférico (evidenciado pela seta preta). Já na Figura 9B, referente ao grupo DIO-N, observa-se que as células musculares apresentam aspecto de estreitamento da fibra, com a presença de núcleo centralizado (setas pretas), compatível com o quadro de hipotrofia muscular. A quantificação da centralização de núcleo (Figura 9C) demonstrou que o grupo DIO-N apresentou maior número de núcleos centralizados ($p < 0,001$) em comparação ao grupo DP-N, compatível com o processo de atrofia muscular.

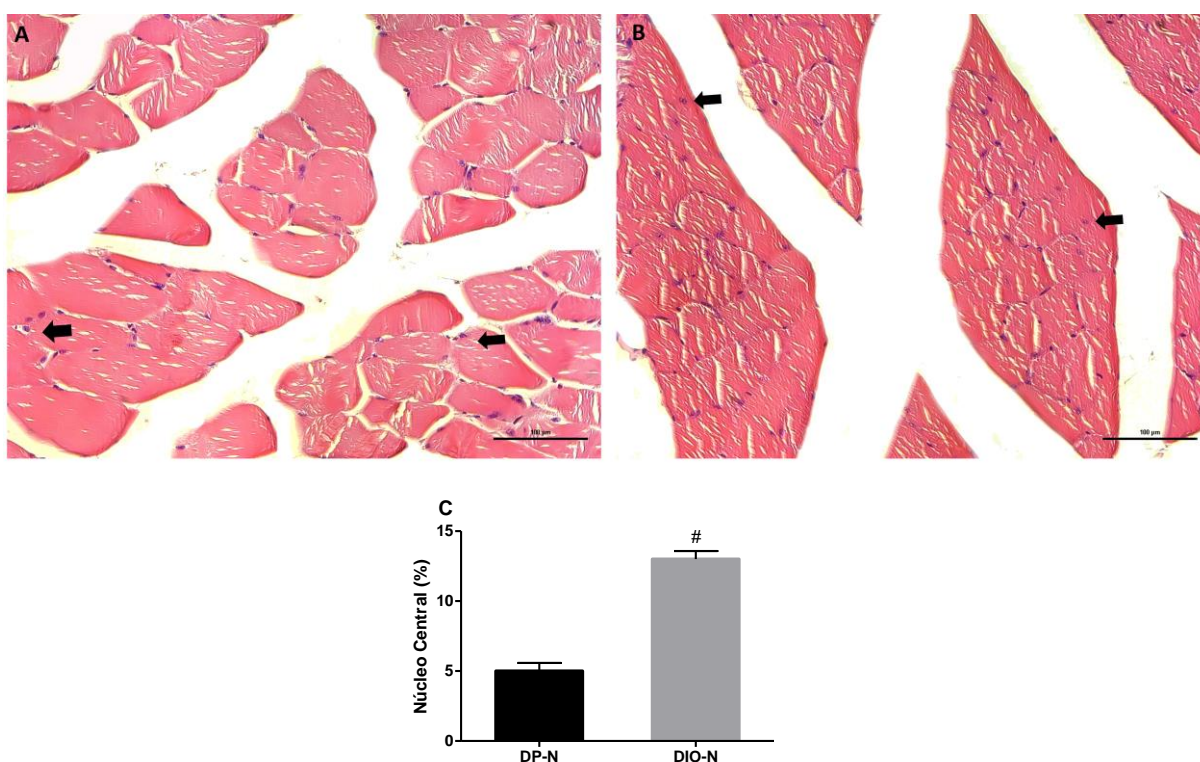


Figura 9: Efeitos do protocolo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DIO) no perfil histológico do tecido muscular esquelético. Imagens representativas de fotomicrografias histológicas de cortes transversais do músculo quadríceps de animais do grupo DP-N (dieta padrão) (A) e DIO-N não treinados (N) (B). Quantificação da porcentagem de centralização de núcleos (C). Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Realizado teste-t de Student para amostras não pareadas. # $p < 0,05$ versus DP-N.

4.4 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, NA RESISTÊNCIA À INSULINA

O TTI foi mensurado 48h após a última sessão de exercício. Nesta etapa o teste teve o intuito de avaliar quais os efeitos do exercício resistido na dinâmica da captação de glicose após estímulo de insulina exógena. Vale ressaltar que este teste foi escolhido em razão do teste de tolerância a glicose pois o intuito era avaliar a ação da insulina e a capacidade dos tecidos alvos em captar a glicose, e como os mesmos se comportavam em jejum e em uma situação de alta concentração de insulina. Não era de interesse testar a função do pâncreas em liberar insulina através de um *overload* de glicose.

Após as 26 semanas de intervenção dietética pode ser observado que o grupo DIO-N aumentou valores tanto de glicemia de jejum (Figura 10A – $p < 0,001$), quando de glicose no teste de TTI (Figura 10C) e da área sob a curva do TTI (10D – $p < 0,001$) em comparação com o grupo DP-N. As diferenças significativas da Figura 10C podem ser observados nos valores absolutos de glicose apresentados na Tabela 5. Também ocorreu prejuízo da taxa de decaimento da glicose (kTTI) na Figura 10E ($p < 0,01$).

Durante o TTI (em valores percentuais brutos), a glicose sanguínea do grupo DIO-N apresentou declínio de 100% (0min) para $80 \pm 4,9\%$ (5min), $73 \pm 2,1\%$ (10min), $70 \pm 4,0\%$ (15min), $64 \pm 6,2\%$ (20min), $62 \pm 7,4\%$ (25min) e $61 \pm 4,8\%$ (30min).

Já após a realização do exercício físico, embora no grupo DP+R não tenha ocorrido diferença significativa nos valores de glicemia de jejum (Figura 10A) e nos valores de glicose relacionados ao teste de TTI (Figura 10C-D e Tabela 5) quando comparado com o grupo DP-N, houve uma grande melhora na kTTI (Figura 10E, $p < 0,05$). Este dado demonstra que o exercício tem um importante efeito na depuração da glicose plasmática, caracterizando uma melhor captação da glicose pelos tecidos alvo. Avaliando os efeitos nos animais que não fizeram controle de ingesta, mas concomitantemente realizaram o treinamento resistido (DIO+R), todos os padrões avaliados também apresentaram melhoras significativas quando comparados ao grupo DIO-N, (glicemia de jejum – $p < 0,001$; área sob a curva TTI – $p < 0,05$ e kTTI – $p < 0,001$).

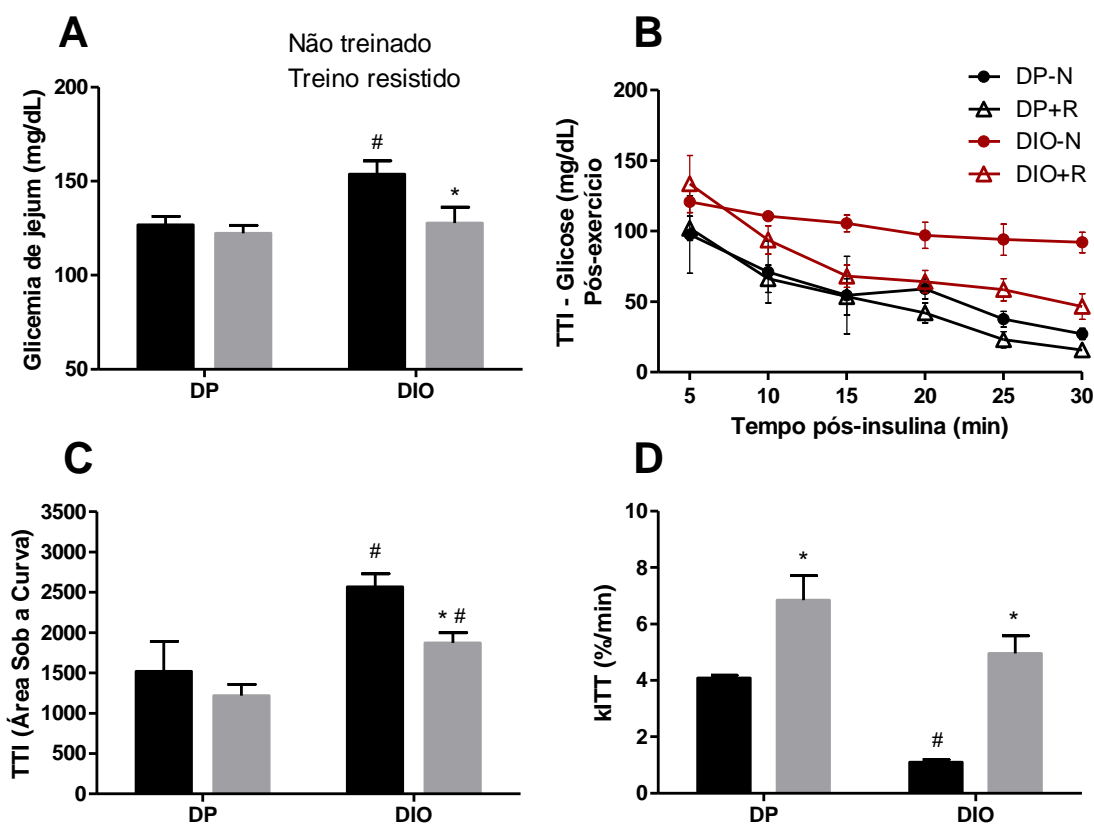


Figura 10: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica na glicemia de jejum e no teste de tolerância à insulina (TTI) ao final do estudo. Após 6h de jejum a glicose foi mensurada (mg/dL) - glicemia de jejum (A). Posteriormente os animais receberam 2U/kg de insulina intraperitoneal. A glicose foi novamente mensurada nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos pós-insulina (B). Dados também demonstrados como a área sob a curva (C) e como taxa de decaimento da glicose no teste de tolerância à insulina (D). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Realizada análise de variância ANOVA duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. DP (dieta padrão); DIO (obesidade induzida por dieta, do inglês *diet-induced obesity*); * $p < 0,05$ versus respectivo grupo não treinado; # $p < 0,05$ versus respectivo grupo dieta padrão.

Esta melhora não pode ser equiparada ao grupo treinado que consumiu dieta padrão (DP+R) pois mesmo com taxas por minuto de decaimento da glicose (kTTI) significativamente iguais (Figura 10E), os valores absolutos de glicose plasmática ao longo de todo o teste (Tabela 5) se mantiveram maior no grupo sem controle de ingesta. Este dado pode ser observado em valores percentuais onde a glicose sanguínea do grupo DIO+R apresentou declínio de 100% (0min) para $105 \pm 15,8\%$ (5min), $73 \pm 7,8\%$ (10min), $53 \pm 6,2\%$ (15min), $50 \pm 6,1\%$ (20min), $46 \pm 6,1\%$ (25min) e $36 \pm 6,9\%$ (30min). Já a glicose do grupo DP+R declinou de 100% (0min) para $83 \pm 7,1\%$ (5min), $54 \pm 7,9\%$ (10min), $44 \pm 10,6\%$ (15min), $34 \pm 5,9\%$ (20min), $19 \pm 4,7\%$ (25min) e $13 \pm 2,7\%$ (30min).

Tabela 5: Valores de glicose (mg/dL) referentes ao Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

Grupos		5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
Pré- exercício	DP	137,0 (19,4)	78,3 (29,8)	66,1 (26,7)	56,0 (23,3)	46,0 (21,8)	34,4 (20,8)
	DIO	175,3 (23,7) [#]	126,8 (10,1) [#]	116,6 (5,3) [#]	106,9 (8,4) [#]	101,0 (4,4) [#]	99,3 (5,1) [#]
Pós- exercício	DP-N	97,5 (27,5)	71,0 (22,0)	54,5 (27,5)	59,0 (7,0)	37,5 (5,5)	27,0 (4,0)
	DP+R	102,0 (8,6) ^{&}	66,3 (9,7) ^{&}	53,5 (13,0)	42,0 (7,2)	23,0 (5,7)	15,8 (3,3)
	DIO-N	120,8 (7,5) [#] ^{\$}	110,5 (3,1) [#] ^{\$}	105,5 (6,0) [#] ^{\$}	97,0 (9,3) [#]	94,0 (11,1) [#]	92,0 (7,3) [#]
	DIO+R	133,5 (20,2) [#] ^{\$}	93,8 (10,0) [#] ^{\$}	68,0 (7,9) ^{**} ^{\$}	64,3 (7,8) ^{**} ^{\$}	58,5 (7,9) ^{**} ^{\$}	46,5 (9,1) ^{**} ^{\$}

Fonte: dados da pesquisa. O teste foi precedido de 6h de jejum. Os animais receberam 2U/kg de inulina intraperitoneal. A glicose foi novamente mensurada nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos pós-insulina. O teste foi realizado no período pré-randomização/pré-exercício (semana 17) e após o término do estudo, caracterizado como período pós-exercício (semana 26). Dados expressos em média \pm desvio padrão. DP (dieta padrão); DIO (obesidade induzida por dieta, do inglês *diet-induced obesity*); DP-N (DP não treinado); DP+R (DP + treino resistido); DIO-N (DIO não treinado); DIO+R (DIO + treino resistido). Para as comparações dentro do período pós-exercício foi realizada análise de variância ANOVA duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. Para comparações entre os grupos DP e DIO pré-exercício foi utilizado teste-t de Student para amostras não pareadas. Para comparações pré e pós-exercício realizado teste-t de Student para amostras pareadas (valor de p especificado no próprio gráfico). Comparações: DP vs. DP-N e DP vs. DP+R; DIO vs. DIO-N e DIO vs. DIO+R. *p<0,05 versus respectivo não treinado do mesmo período; #p<0,05 versus respectivo grupo dieta padrão do mesmo período; &p<0,05 versus DP pré-exercício; \$p<0,05 versus DIO pré-exercício.

4.5 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, NA SINALIZAÇÃO MOLECULAR E NA MODULAÇÃO GÊNICA DA CAPTAÇÃO DE GLICOSE NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

4.5.1 Western Blot

Com intuito de avaliar a via molecular de sinalização responsável pela captação de glicose sensível à insulina, o conteúdo total e fosforilado da Proteínas Quinase B (AKT) e da Glicogênio Sintase 3 beta (GSK3 β) foram avaliados no tecido muscular. As imagens representativas da técnica podem ser visualizadas na Figura 11A. Não ocorreram diferenças significativas em ambas as moléculas quando o exercício foi realizado na condição de dieta padrão (DP+R), nem quando os animais foram expostos à dieta hiperlipídica (DIO-N). Porém, quando os fatores dieta hiperlipídica e exercício resistido foram associados (DIO+R), ocorreu um aumento do conteúdo fosforilado (em resíduo de serina 473) da proteína Akt (Figura 11C), que foi significativamente maior que ambos os grupos DP+R e DIO-N ($p < 0,05$).

Outra molécula envolvida na captação de glicose que sofre influência direta do exercício físico é a Proteína Quinase Ativada por 5' Adenosina Monofosfato alfa (AMPK α), com seu sítio de fosforilação em resíduo de treonina 172. A AMPK está envolvida na via de translocação do GLUT4 e é ativada pelo exercício físico ou pela privação de nutrientes. Este quadro pode ser confirmado observando o aumento da fosforilação da AMPK no grupo DP+R ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo DP-N (Figura 11D). Após o período de treinamento o grupo DIO+R teve aumento significativo na fosforilação da AMPK quando comparado ao grupo DIO-N ($p < 0,001$), e nenhuma diferença foi observada quando comparado com o grupo DP+R (Figura 11D).

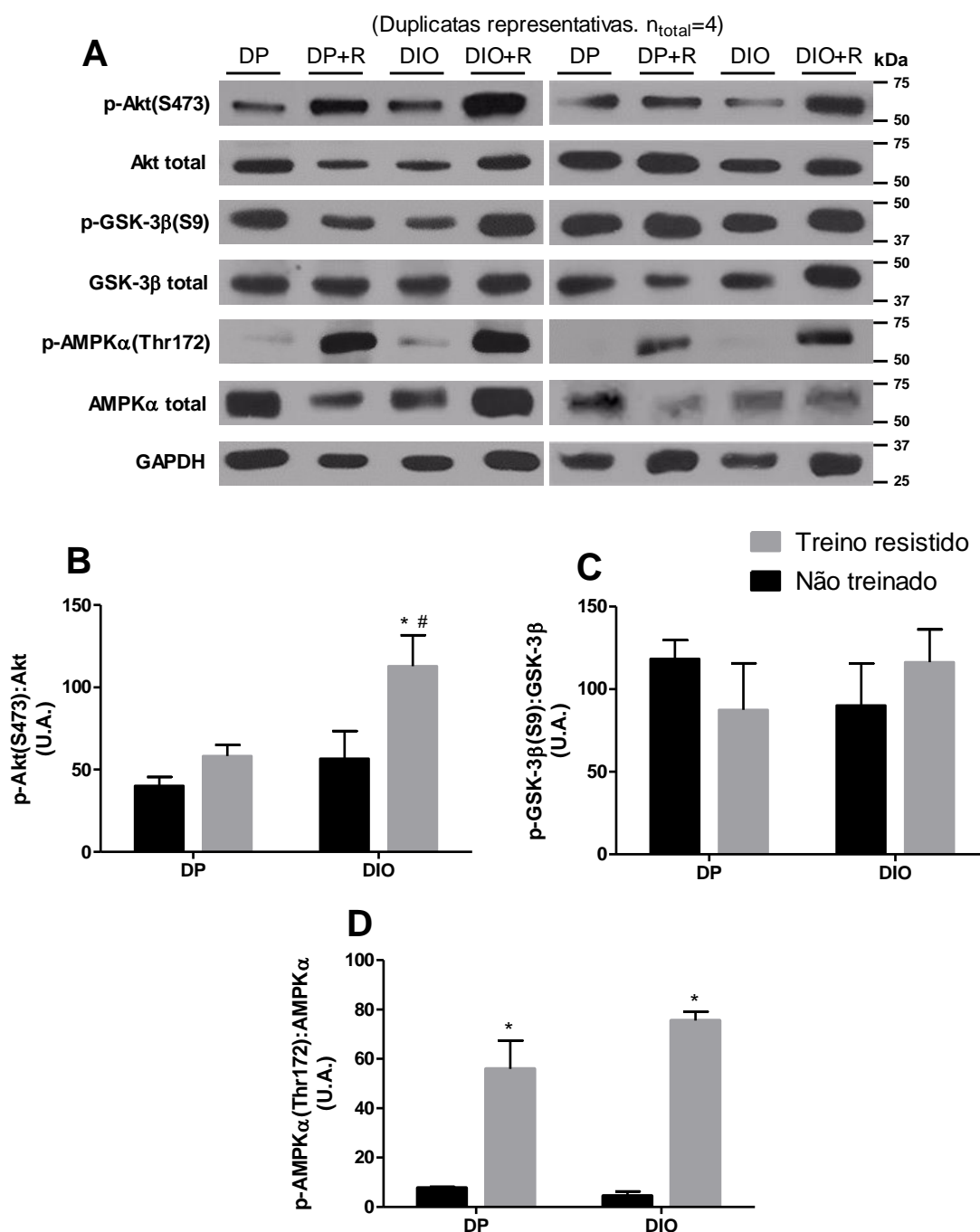


Figura 11: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica na via de sinalização da insulina no tecido muscular esquelético. Bandas representativas da técnica de Western Blot no músculo gastrocnêmio **(A)**. Conteúdo fosforilado em razão do total das proteínas Proteína Quinase B (Akt) **(B)**, Glicogênio Sintase 3 beta (GSK-3 β) **(C)** e Proteína Quinase Ativada por 5' Adenosina Monofosfato alfa (AMPK) **(D)** no tecido muscular esquelético (coleta realizada em estado não alimentado, sem estímulo de insulina). Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Realizada análise de variância ANOVA duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. DP (dieta padrão); DIO (obesidade induzida por dieta, do inglês *diet-induced obesity*); * $p < 0,05$ versus respectivo grupo não treinado; # $p < 0,05$ versus respectivo grupo dieta padrão.

4.5.2 PCR

Foi avaliado a expressão gênica de quatro moléculas envolvidas na captação da glicose/exercício: a AMPK α 2 e o Substrato da toxina botulínica C3 relacionado a Ras 1, também conhecido como Rac1, a Calmodulina (CaM) e a Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina beta (CaMKK2 β). Pode ser observado que o grupo DIO-N apresentou um aumento da expressão da Rac1 ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo DP-N. O exercício físico por si (DP+R) também foi capaz de aumentar a expressão dessa molécula ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo não treinado (DP-N). Interessantemente, o grupo que consumiu dieta hiperlipídica e realizou o exercício resistido (DIO+R) teve a expressão de Rac1 elevada em relação ao grupo DIO ($p < 0,05$), e não teve diferença em relação do grupo DP+R (Figura 12A). As outras análises não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figuras 12B e C).

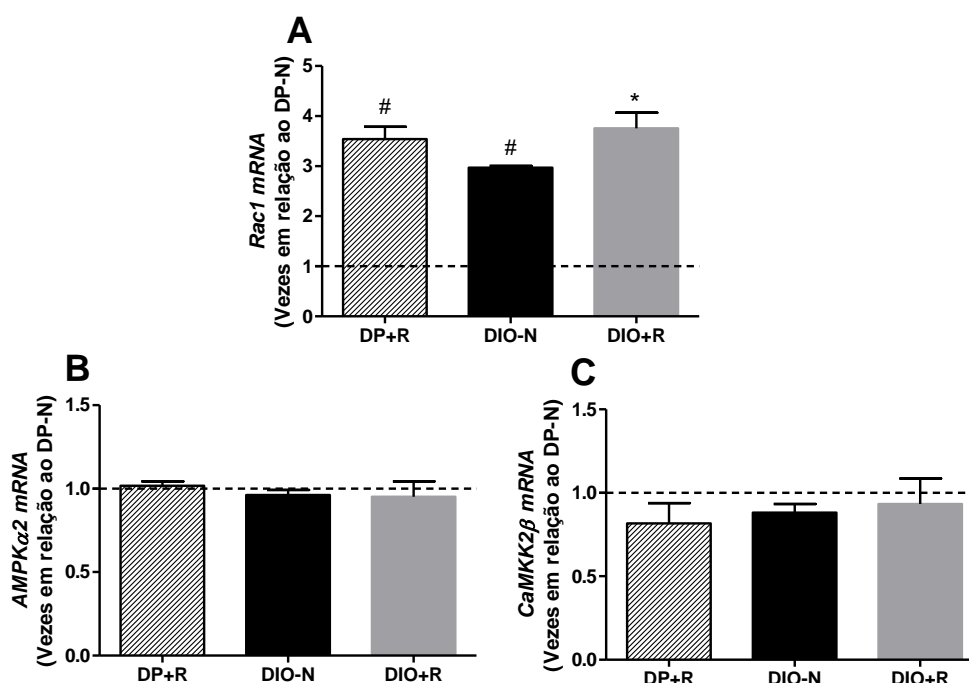


Figura 12: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica na expressão gênica (mRNA) de moléculas envolvidas na captação de glicose no tecido muscular esquelético. mRNA do Substrato da toxina botulínica C3 relacionado a Ras 1 (Rac1) (**A**), Proteína Quinase Ativada por 5' Adenosina Monofosfato alfa 2 (AMPK α 2) (**B**) e Proteína Quinase dependente de cálcio/calmodulina 2 beta (CaMKK2 β) (**C**) em músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Dados apresentados como razão em relação ao grupo DP-N (linha basal/baseline em valor de 1). Realizado teste-t de Student para amostras não pareadas. A expressão relativa do mRNA foi determinado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. DP-N (dieta padrão não treinado); DP+R (DP + treino resistido); DIO-N (obesidade induzida por dieta não treinado); DIO+R (DIO + treino resistido). # $p < 0,05$ versus DP-N (linha basal). * $p < 0,05$ versus DIO.

4.6 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DAS MAPK'S NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

As análises a seguir revelam o papel do treinamento resistido sobre parâmetros inflamatórios em condições de uma dieta hiperlipídica.

Com base no ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) foi avaliado o processo de ativação inflamatória via fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e pelo aumento da Interleucina 1 beta [IL1 β]. A ingestão crônica de dieta hiperlipídica (grupo DIO-N) foi capaz de aumentar o conteúdo tanto de TNF- α (Figura 13A – $p < 0,001$) quanto de IL1 β (Figura 13B – $p < 0,001$), quando comparado ao grupo DP-N. O treinamento resistido, mesmo frente ao contínuo consumo da dieta hiperlipídica (grupo DIO+R), reverteu o aumento de ambas as moléculas (TNF α e IL1 β) de maneira similar ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo DIO-N. O mesmo grupo obteve valores semelhantes ao grupo DP+R.

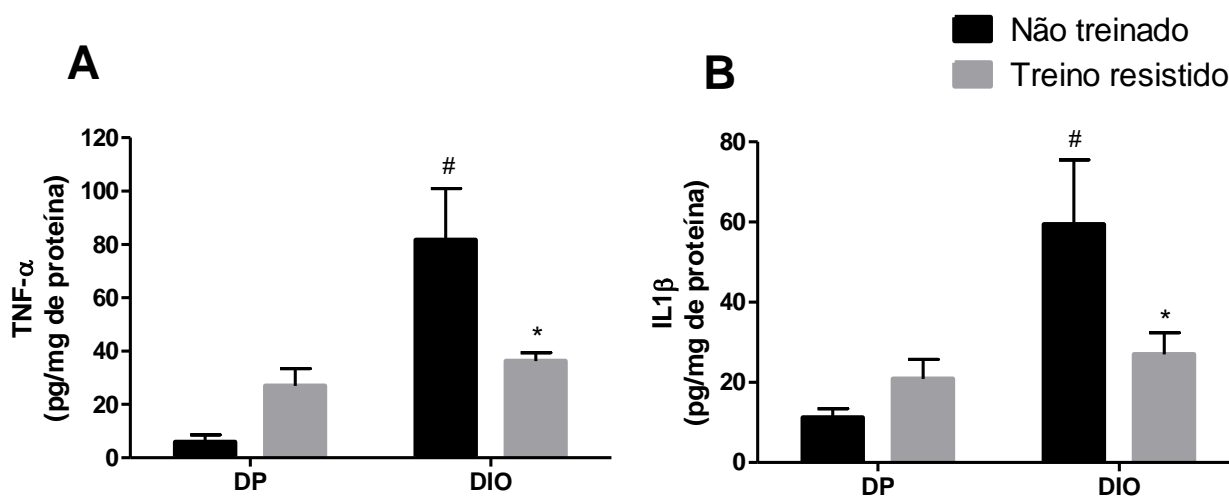


Figura 13: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica sobre marcadores inflamatórios no tecido muscular esquelético. Conteúdo de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*) (A) e IL1 β (interleucina 1 beta) (B) no músculo quadríceps. Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Realizado teste de variância ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. DP (dieta padrão); DIO (obesidade induzida por dieta, do inglês *diet-induced obesity*). * $p < 0,05$ versus respectivo grupo não treinado; # $p < 0,05$ versus respectivo grupo dieta padrão.

Outra via avaliada foi a das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (MAPK's) através da expressão gênica da Quinase regulada por sinal extracelular 1 (ERK1), também conhecido como MAPK1, e da c-Jun quinases terminais N 1 (JNK1),

também conhecida como MAPK8 (Figuras 14A e 14B respectivamente). A dieta hiperlipídica (DIO-N) aumentou a expressão da JNK1 ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (DP-N). O treinamento resistido reduziu a expressão do mesmo ($p < 0,05$) em comparação com o grupo DP-N. A dieta hiperlipídica continuou sendo deletéria no grupo DIO+R pois o exercício não foi capaz de controlar o aumento da expressão da JNK1 neste grupo, não sendo capaz de equiparar os valores com seu grupo controle (DP+R), mantendo uma diferença significativa com o $p < 0,01$.

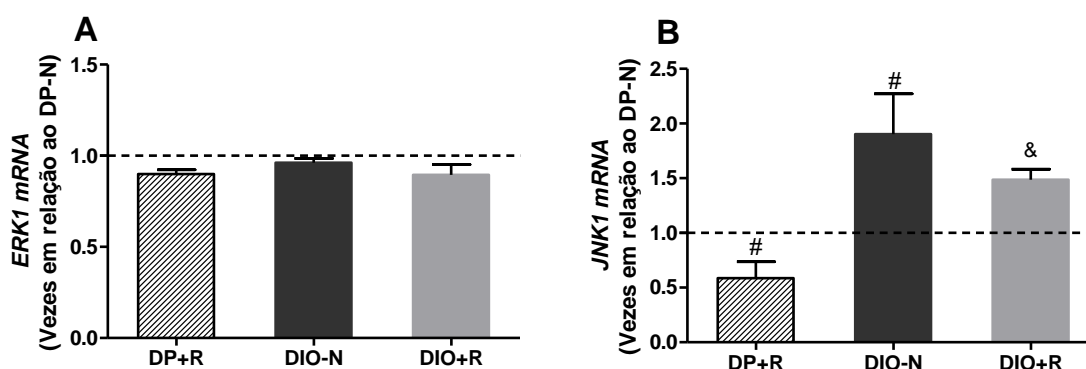


Figura 14: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica sobre a expressão gênica (mRNA) de moléculas da via das MAPK's no tecido muscular esquelético. Quinase regulada por sinal extracelular 1 (ERK1) (A) e C-Jun quinases terminais N 1 (JNK1) (B) no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Dados apresentados como razão em relação ao grupo DP-N (linha basal/baseline em valor de 1). Realizado teste-t de Student para amostras não pareadas. A expressão relativa do mRNA foi determinado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. DP-N (dieta padrão não treinado); DP+R (DP + treino resistido); DIO-N (obesidade induzida por dieta não treinado); DIO+R (DIO + treino resistido); Proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK's). # $p < 0,05$ versus DP-N (linha basal). & $p < 0,01$ versus DP+R.

4.7 EFEITO DO TREINO RESISTIDO, ASSOCIADO OU NÃO À DIETA HIPERLIPÍDICA, SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

Em relação à modulação de parâmetros do estado redox da célula no tecido muscular esquelético, foram avaliados inicialmente a formação de ERO através da oxidação do de DCFH (Figura 15A), e o dano oxidativo proteico através da formação de grupamento carbonilas (Figura 15B) e danos oxidativo lipídico (através da formação de MDA (Figura 15C). Embora não estatístico ($p < 0,093$) houve um aumento da oxidação do DCFH de 58% quando comparado ao grupo DP-N. Já o exercício resistido (DIO+R), mesmo frente ao consumo da dieta hiperlipídica, foi capaz de

reverter este quadro ($p < 0,05$ vs. DIO-N). Não houve diferenças significativas nos testes de carbonilação proteica e lipoperoxidação. Porém, quando avaliadas as enzimas do sistema de defesa antioxidantes como SOD e a CAT, o consumo crônico de dieta hiperlipídica (grupo DIO-N) levou a uma diminuição da atividade de ambas, com valores de $p < 0,001$ quando comparado ao grupo DP-N. Já o treinamento resistido (DIO+R), mesmo frente ao consumo da dieta hiperlipídica, foi capaz de restaurar a atividade ambas moléculas de defesas endógenas à níveis basais ($p < 0,05$ versus DIO-N) (SOD - Figura 15D; CAT – Figura 15E).

Outro sistema de defesa antioxidante envolvido na detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos é o da oxirredução da glutathiona. Por isso foram analisados os conteúdos da glutathiona total (GSH) e da glutathiona oxidada (GSSG) e calculado a razão entre ambas para avaliar a eficácia do sistema. Como demonstrado nas Figura 15F-H o grupo DIO-N não causou prejuízos ao sistema glutathiona. O exercício resistido, em uma condição de controle de ingesta (grupo DP+R), foi capaz de diminuir o conteúdo de GSSG, melhorando assim a razão GSH/GSSG.

Também foi avaliada a expressão gênica das subunidades do complexo proteico Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida Oxidase (NADPH Oxidase). Juntas, as proteínas do complexo têm a capacidade de transportar elétrons pela membrana e formar o radical superóxido, que está envolvido tanto em processos fisiológicos necessários ao bom funcionamento celular, quanto em processos patológicos como o quadro de estresse oxidativo presente na obesidade. O exercício resistido (DP+R) foi capaz de aumentar a expressão da subunidade de membrana NOX4 ($p < 0,05$), da subunidade de membrana auxiliar p22^{phox} ($p < 0,05$), e da subunidade citosólica p47^{phox} ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo DP-N. Já a dieta hiperlipídica (DIO-N) aumentou a expressão relativa do mRNA de todas as subunidades avaliadas quando comparada com o grupo DP-N: as de membrana gp91^{phox} ($p < 0,01$) e NOX4 ($p < 0,01$), da subunidade de membrana auxiliar p22^{phox} ($p < 0,05$), da subunidade citosólica ativadora p47^{phox} ($p < 0,05$), e da subunidade citosólica auxiliar p67^{phox} ($p < 0,001$) (Figuras 16A-E, respectivamente).

Mesmo que ambos os grupos tenham apresentado este aumento, ele não foi equiparado na subunidade de membrana NOX4, onde o grupo DIO-N ainda apresentou um aumento significativamente maior ($p < 0,0258$) que o grupo DP+R (Figura 16B). O exercício resistido associado ao consumo da dieta hiperlipídica

(DIO+R) apresentou diferença significativa somente na subunidade gp91^{phox} (Figura 16A), onde houve uma redução da expressão ($p < 0,01$) em relação ao grupo DIO-N.

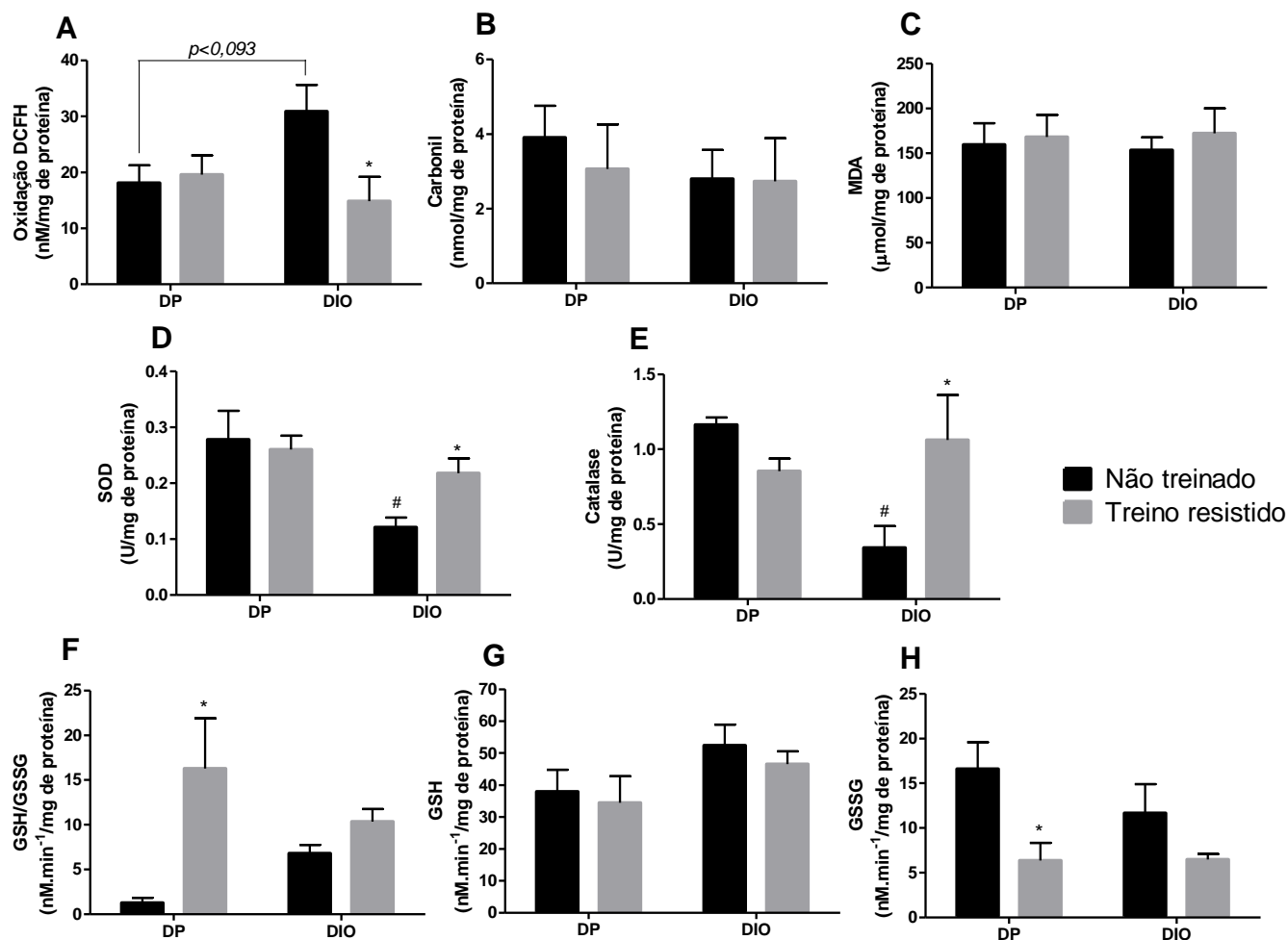


Figura 15: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica sobre parâmetros de estresse oxidativo do tecido muscular esquelético. Marcador de presença de espécies reativas através da oxidação da diclorodihidrofluorescína (DCFH) por espécies reativas (A); carbonilação de proteínas por espécies reativas (B); marcador de dano em lipídeos através da presença de malondialdeído (MDA), produto da oxidação de lipídeos (C); atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (D) e catalase (CAT) (E). Glutaciona total expressa através da razão (F) dos conteúdos de glutaciona reduzida (G) e glutaciona oxidada (H) no músculo quadríceps. Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Realizada análise de variância ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni quando necessário. DP (dieta padrão); DIO (obesidade induzida por dieta). * $p < 0,05$ versus respectivo grupo não treinado; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ versus respectivo grupo dieta padrão.

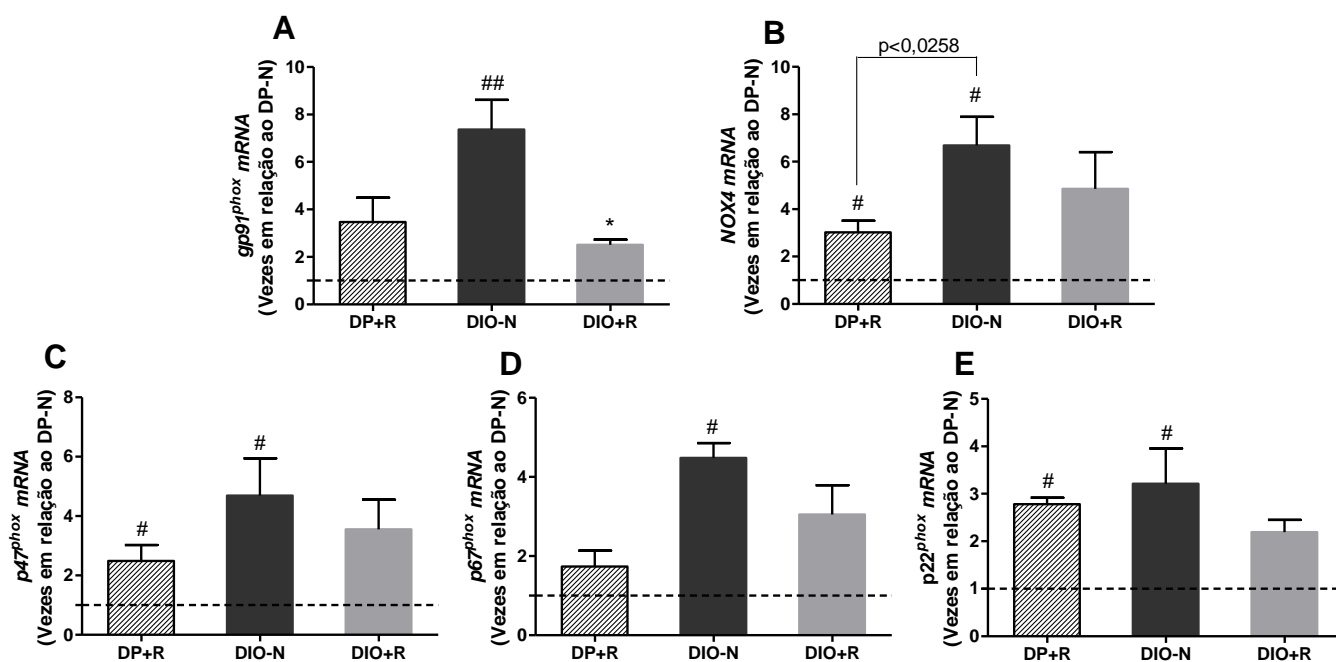


Figura 16: Efeitos do exercício resistido associado ou não à dieta hiperlipídica sobre a expressão gênica (mRNA) de subunidades da proteína NADPH oxidase. Isoformas de subunidades de membrana gp91^{phox} (A) e NOX4 (B); subunidade citosólica ativadora p47^{phox} (C); subunidade citosólica auxiliar p67^{phox} (D) e subunidade de membrana auxiliar p22^{phox} (E) em músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Dados apresentados como razão em relação ao grupo DP-N (linha basal/baseline em valor de 1). Realizado teste-t de Student para amostras não pareadas. A expressão relativa do mRNA foi determinado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. DP-N (dieta padrão não treinado); DP+R (DP + treino resistido); DIO-N (obesidade induzida por dieta não treinado); DIO+R (DIO + treino resistido). # $p < 0,05$ versus DP-N (linha basal). * $p < 0,05$ versus DIO. & $p < 0,05$ versus DP+R.

5 DISCUSSÃO

No outro extremo da escala de desnutrição, a obesidade é um dos problemas de saúde pública mais emergentes da atualidade. É uma condição complexa com sérias dimensões sociais e psicológicas que afeta praticamente todos os grupos etários e socioeconômicos, e ameaça à saúde pública de países desenvolvidos e em desenvolvimento (WHO, 2019). Do ponto de vista biológico, a obesidade é uma doença multifatorial que envolve processos bioquímicos e moleculares complexos de vários órgãos e sistemas. Por isso, o conhecimento aprofundado destes processos é necessário para melhor compreender o desenvolvimento de comorbidades, e direcionar os biomarcadores causadores de doenças em estratégias de prevenção personalizadas (Nimptsch et al., 2019). Para além do excesso de consumo alimentar, ou da alimentação de baixo poder nutritivo e alto valor calórico, os baixos níveis de atividade física ou o sedentarismo são comportamentos físicos que também contribuem para o advento da obesidade, além de serem considerados fatores de risco para as doenças cardiovasculares e outra variedade de doenças crônicas como hipertensão, doenças articulares, depressão e, inclusive, a obesidade e a DMT2 (Warburton et al., 2006).

Com base nesse pressuposto o exercício físico se faz necessário para prevenção e tratamento da obesidade e comorbidades associadas. Até o presente momento, estudos trazem que exercícios de resistência e aeróbicos são recomendados como tratamentos eficazes para pessoas com obesidade e DMT2 (Yang et al., 2014; Xiao e Fu, 2015; Villareal et al., 2017; García-Hermoso et al., 2018). No entanto, a escolha do tipo ideal de exercício para estas doenças deve ser respaldada por critérios biológicos, que ainda precisam ser melhor investigados. Nesse cenário, pesquisas acerca dos efeitos do exercício aeróbio já são amplas e largamente veiculadas em diferentes consensus e periódicos. Em contraste, poucas informações estão disponíveis em torno do exercício físico resistido, em particular, que detalhem com clareza os efeitos bioquímicos e moleculares no músculo esquelético.

No presente trabalho, camundongos Swiss machos foram alimentados por 17 semanas com dieta hiperlipídica a fim de desenvolver obesidade associada à resistência à insulina. Concomitante à continuidade da dieta, os animais foram submetidos a um protocolo de exercício resistido, de 8 semanas de treinamento.

Para promover um quadro de obesidade associada à resistência à insulina, os animais foram alimentados com uma dieta hiperlipídica e hipercalórica (5,3kcal/g), com acréscimo de 60,6% do valor calórico da dieta padrão utilizada pelo grupo controle (3,3kcal/g). Estes valores demonstram que os animais foram expostos a um consumo calórico excessivo que está diretamente relacionado à instalação do quadro de obesidade (Howell e Kones, 2017). As fontes de gordura da dieta hiperlipídica eram provenientes principalmente de gordura animal saturada (a banha de porco constituía 88,6% das gorduras presentes na mistura), sendo o restante óleo de soja, totalizando 59% das calorias proveniente de lipídeos. A dieta também possuía uma associação de 26% das calorias provenientes de fontes de carboidratos, sendo estes carboidratos refinados (amido de milho) e sacarose.

O consumo de gorduras saturadas e sua associação com a saúde ainda é um tema controverso na área acadêmica e médica. No mais recente estudo publicado referente a alimentação saudável com base sustentável, uma comissão de pesquisadores aponta que embora a ingestão de ácidos graxos tenha sido extensivamente estudada em relação à riscos de doenças, a maioria das recomendações ainda sugerem a redução ou limitação da gordura total ingerida. Eles apontam que para que exista um equilíbrio entre sustentabilidade ambiental e alimentação saudável, é favorável o consumo de dieta à base de plantas e a redução do consumo de proteína animal, reduzindo também o consumo de gordura animal (Willett et al., 2019). Já em um estudo coorte PURE (Estudo Epidemiológico Urbano e Rural Prospectivo) (Dehghan et al., 2017) não foi encontrada associação entre o consumo de gorduras totais, gorduras saturadas e insaturadas com riscos de infarto do miocárdio ou com mortalidade por doenças cardiovasculares.

Porém, é clinicamente relevante distinguir entre as fontes de gorduras saturadas e sua relação com os riscos à saúde. Base para esta afirmação encontra-se em outro estudo epidemiológico (estudo caso-coorte EPIC - Investigação Prospectiva Europeia sobre Câncer e Nutrição), que acompanhou 12.403 indivíduos com incidente de DM2 e uma subcoorte representativa de 16.154 indivíduos, demonstrou que ácidos graxos de cadeia regular (ácido mirístico [14:0], ácido palmítico [16:0] e ácido esteárico [18:0]) estão positivamente associados com DM2. Em contraste, ácidos graxos de cadeia ímpar (ácido pentadecanóico [15:0] e ácido heptadecanóico [17:0]), bem como os ácidos graxos de cadeia mais longa (ácido araquídico [20:0], ácido beénico [22:0], ácido tricosanoico [23:0] e ácido lignocérico

[24:0]) foram inversamente associados com o incidente da doença. O estudo concluiu que diferentes ácidos graxos saturados de fosfolípidios plasmáticos individuais estão associados com DMT2 em direções opostas, o que sugere que ácidos graxos saturados não são homogêneos em seus efeitos (Forouhi et al., 2014).

Outros estudos clínicos também demonstram que o consumo de gorduras saturadas de cadeia média (contendo de 6 a 12 carbonos) melhora a composição corporal reduzindo o ganho de peso, o acúmulo de gordura e o armazenamento de gordura em modelos animais, e aumentando a perda de peso em estudo com humanos. Estes fatores ocorrem possivelmente pelo aumento do gasto de energia, da oxidação de gordura e da saciedade em comparação com o consumo de gorduras saturadas de cadeia longa (ver revisão de Bhavsar e St-Onge, 2016). Porém, Turner et al. (2009) enfatizam que a quantidade consumida é fator relevante. Mesmo frente aos efeitos benéficos demonstrados na literatura, o consumo excessivo de ácidos graxos de cadeia média (59% das calorias provenientes deste tipo de gordura) foi tecido-dependente, induzindo resistência à insulina no fígado no mesmo nível que o consumo de ácidos graxos de cadeia longa. Porém vale ressaltar que mesmo com o consumo elevado, houve preservação da ação da insulina no músculo esquelético associado ao potente efeito estimulador de biogênese mitocondrial. Já o consumo de ácidos graxos saturados de cadeia longa (de 13 a 21 carbonos), segundo Luukkonen et al. (2018) leva ao aumento dos índices de colesterol circulantes, da deposição de gordura no fígado, e outros fatores que podem predispor à resistência à insulina.

Prévios estudos (não publicados) conduzidos durante o período sanduíche desta tese demonstram que a exposição de células musculares L6 ao ácido palmítico, ou palmitato ($C_{16}H_{32}O_2$), um ácido graxo saturado de cadeia longa (16:0), pode levar à resistência à insulina com déficit na captação de glicose dependente de insulina (Figura Suplementar 1 – Apêndice A). Outros trabalhos também suportam estes dados demonstrando que a exposição de células musculares ao palmitato (1-800 μ M por 1h) aumenta a fosforilação acetil-coenzima A carboxilase de forma dose-dependente, consequentemente diminuindo a formação de malonil-CoA, desinibindo a carnitina palmitoiltransferase-1, aumentando assim a translocação e oxidação mitocondrial de ácidos graxos livres de cadeia longa, que em excesso, pode ser tóxico para a célula muscular (Fediuc et al., 2006). Outro estudo do mesmo grupo, avaliando efeitos metabólicos da glicose, demonstrou que exposição aguda ao palmitato (400 μ M por 1h) aumentou a captação de glicose e a síntese de glicogênio, porém com o tempo

de incubação progredindo para 8h, na presença do palmitato (exposição crônica), esses aumentos foram cessados e uma inibição tempo-dependente da captação de glicose (~65%) e da síntese de glicogênio (~30%) foram observadas (Pimenta et al., 2008).

Embora os ácidos graxos saturados tenham seu papel essencial e indiscutível como moléculas biológicas ativas tanto em processos fisiológicos como patológicos, várias complexidades impedem a previsão simplificada de seus efeitos na saúde. Bahnson et al. (2014) trazem o alerta de que além de seu papel histórico no colesterol LDL sanguíneo, no seu papel fisiológico associado às lipoproteínas, e respostas glicose-insulina, seus efeitos também dependem das comparações e interações com outros nutrientes, como proteínas e carboidratos. Por isso, o consumo de carboidratos é outro fator a ser levado em consideração na dieta ofertada aos animais deste trabalho. Mesmo que a composição da dieta tenha somente 26% das calorias provenientes de carboidratos, suas fontes eram basicamente carboidrato refinado (amido de milho) e sacarose. A literatura não sugere uma proporção específica de consumo diário de carboidratos, mas recomenda que as fontes energéticas deste nutriente não ultrapassem 60% do consumo total. Os autores ainda sugerem que seja enfatizado o consumo de grãos integrais, pois o refinamento de grãos leva a uma grande perda dos nutrientes e das fibras, com grandes implicações negativas para a saúde (Willett et al., 2019). Estudos demonstram que os grãos refinados são uma fonte importante de carboidratos de alto índice glicêmico, que têm efeitos metabólicos adversos e que estão associados com risco aumentado de anormalidades metabólicas, ganho de peso e doença cardiovascular (Hu, 2010; Jakobsen et al., 2010; Mozaffarian et al., 2011). Já o consumo de grãos integrais e fibras de fontes de grãos tem associação com redução do risco de doença coronariana, DMT2 e mortalidade em geral (Zong et al., 2016). Por fim, em relação a sacarose presente na dieta dos animais destes estudo, as recomendações nutricionais orientam que o consumo de açúcar não deve ultrapassar 5% do consumo energético total diário (Willett et al., 2019). O alto consumo de açúcar está também associado ao ganho de peso e ao DTM2 (Malik et al., 2010; Morenga et al., 2013). Todo esse apanhado de referências sustenta, então, a composição da dieta hiperlipídica/hipercalórica ofertada aos animais deste estudo para a finalidade de induzir um quadro de obesidade associada à resistência à insulina.

Devido à alimentação hiperlipídica ofertada, os animais alimentados com esta dieta, durante o período de indução da obesidade (17 semanas), aumentaram quase metade do seu peso inicial (ganho de 47% de peso corporal total) e ainda apresentaram uma diferença significativa de peso (27%) em relação ao controle da mesma idade que consumiu dieta padrão. A diferença de peso entre o grupo controle e o grupo obeso iniciou a partir da oitava semana de dieta e se manteve até o final do estudo.

O primeiro teste de tolerância à insulina (TTI) foi realizado na oitava semana, porém não foi encontrado nenhuma alteração, demonstrando que mesmo os animais já apresentando alto peso, ainda não apresentavam resistência à insulina detectável pelo teste de TTI. O TTI foi novamente realizado novamente na 17ª semana e a resistência à insulina foi então detectada. Estes resultados corroboram com estudo de White et al. (2013), onde animais Swiss alimentados com dieta hiperlipídica também apresentaram aumento de peso e resistência à insulina com 10 semanas. A escolha de prolongar o protocolo deste estudo por 17 semanas foi baseado no protocolo de Wang e Liao (2012), que descreve que um modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos leva de 16 a 20 semanas, tempo necessário para que as múltiplas alterações de órgãos e sistemas da doença estejam devidamente instalados.

Com os quadros de obesidade e resistência à insulina instalados, os animais iniciaram o protocolo de treino de resistência. Avaliando os animais obesos não treinados, a continuidade da dieta hiperlipídica levou ao aumento progressivo do peso até na semana 22, sem ganho adicional até a semana 26. So et al. (2011) detectaram, em ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica que, em uma semana de protocolo alimentar, o consumo de oxigênio aumentou em relação aos controles dieta padrão, enquanto a oxidação dos ácidos-graxos aumentava progressivamente. Também avaliaram neste período o gasto energético aumentou inicialmente, mas depois diminuiu à medida que a atividade deambulatoria do ciclo claro/escuro atingiu valores ~ 38% inferiores aos controles.

Mesmo frente à continuidade da ingestão da dieta hiperlipídica, o protocolo de treinamento resistido foi capaz de impedir a continuidade de ganho de peso corporal. Ao final do período experimental os animais obesos e treinados apresentaram um menor peso que o grupo obeso não treinado, bem como manteve o peso corporal mesmo consumindo dieta hiperlipídica. Mesmo que estatisticamente a média deste grupo não tenha diferença, clinicamente os valores possuem relevância e merecem

destaque. Dos 6 animais do grupo, 4 deles perderam peso em relação ao início do exercício, e somente 2 apresentaram delta positivo em relação ao início do protocolo. Alguns dos animais chegaram a perder de 6 a 11g, o que equivale entre 10 a 20% do peso corporal total. Com as devidas ressalvas e diferenças, em uma situação hipotética de um homem adulto, medindo 1,80m, com o peso de 100kg, seu IMC seria de 30,86kg/m², valor dentro da faixa de obesidade grau I. Perdendo 10% de seu peso, ele iria para 90kg, trazendo seu IMC para 27,78kg/m², o que sairia da faixa de obesidade para a sobrepeso; e perdendo 20% do peso corporal, ele ficaria com 80kg, com IMC de 24,69kg/m², ficando então dentro dos valores de peso e IMC normais, e fora da faixa de risco. Desta forma, o exercício resistido parece ser um importante aliado para o controle de peso corporal mesmo em uma situação onde não há controle de ingestão.

Resultados semelhantes foram encontrados em modelos similares com ratos Wistar onde a oferta de dieta hiperlipídica por 24 semanas levou ao aumento do peso dos animais, e o exercício resistido de escalada realizado por 12 semanas (associado ao consumo da dieta hiperlipídica) foi capaz de controlar e reduzir o ganho de peso excessivo induzido pela dieta (Leite et al., 2013). Porém, vale ressaltar que não foi possível avaliar se o grupo exercício efetivamente perdeu peso após o início do protocolo de treinamento pois os autores somente forneceram os dados de peso finais de cada grupo e a comparação com o grupo obeso não treinado. Já trabalho de Botezelli et al. (2016) trazem resultados que corroboram com os apresentados no presente estudo onde, o treinamento de força foi capaz de controlar a resistência à insulina e a inflamação independente da perda de peso em animais alimentados com uma dieta com altas quantidades de frutose.

A alimentação em excesso que desencadeia este aumento de peso corporal também está intimamente relacionada ao acúmulo de gordura. Klötting et al. (2010) compararam indivíduos obesos com a mesma circunferência abdominal, sendo um grupo com acúmulo de gordura abdominal predominantemente subcutâneo, e o outro com o acúmulo de gordura basicamente no espaço visceral. Os resultados demonstraram que os primeiros, mesmo obesos, são sensíveis à insulina, e o segundo grupo, resistente à ação do hormônio. Os autores concluíram que a disfunção do tecido adiposo, e sua relação com a resistência à insulina, é caracterizada por predomínio de acúmulo de gordura visceral e que aumento do

tamanho do adipócito (hipertrofia) é fator mais predisponente para a doença que o aumento do número destes (hiperplasia).

Estas informações corroboram com os dados encontrados neste trabalho. Além das alterações de peso corporal total, a dieta hiperlipídica foi capaz de alterar o perfil do tecido adiposo com aumento do índice de adiposidade, aumento do peso da gordura subcutânea inguinal e das gorduras viscerais epididimal, perirenal, retroperitoneal e mesentérica. Também teve efeito sobre o aumento do diâmetro do adipócito do tecido branco inguinal. Como a expansão adiposa hipertrófica, através do aumento do tamanho dos adipócitos, está associada a fenômenos prejudiciais como o aumento da liberação de ácidos graxos não esterificados, liberação de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de células imunes, hipóxia, fibrose, diminuição da adiponectina e sensibilidade à insulina (Choe et al., 2016), se supõe que a diminuição do tamanho do adipócito ocorrida nestes estudo, em função do treinamento resistido, foi um dos fatores que contribuiu para a melhora do quadro de resistência à insulina sistêmico, dos parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo do tecido muscular esquelético. Embora não apresentando efeito significativo sobre o índice de adiposidade, o exercício resistido teve uma tendência a diminuir este percentual. Enquanto o grupo obeso apresentou um índice de 11,28% de gordura em relação ao peso corporal total, o grupo obeso treinado apresentou o valor de 7,78%.

Em relação ao peso individual de cada gordura avaliada, o exercício resistido não gerou perda significativa de gordura quando avaliada a média total do grupo DIO+R. Porém, vale ressaltar este estudo avaliou as gorduras de forma individualizada. Já um estudo de Souza et al. (2014), utilizando absorciometria por raios X de dupla energia ou DEXA (do inglês *Dual-energy X-ray absorptiometry*), avaliou o percentual de gordura total de todo o corpo em ratos submetidos a dieta hiperlipídica 13 semanas, e posteriormente treinados com exercício resistido (com continuidade da dieta). Os autores demonstram que o grupo obeso sedentário apresentou um aumento de aproximadamente 20% de gordura corporal em relação do grupo controle dieta padrão. Já os animais obesos submetidos ao treinamento resistido apresentaram uma perda significativa de aproximadamente 10% em relação ao grupo obeso sedentário, valores estes próximos aos encontrados neste estudo, de 7,78%.

Pessoas com DMT2 também tem um risco aumentado de apresentar disfunções musculares. Isso é considerado por vários estudo onde a DMT2 está

associada à fraqueza, perda de força e potência muscular (Orlando et al., 2016). Outro fator deletério importante encontrado neste trabalho, causado pelo protocolo de obesidade, foi observado na análise histológica do quadríceps. As fibras com aspecto de estreitamento demonstram quadro compatível com hipotrofia muscular, e o núcleo centralizado pode ser visto como consequência de contínua tentativa de reparo de lesão muscular (Folker e Baylies, 2013). Estas deficiências podem estar associadas a uma suposta alteração das células satélites do tecido muscular, o que pode comprometer o quadro de regeneração do tecido (Akhmedov e Berdeaux, 2013), bem como à glicação da miosina e a diminuição da ATP intramuscular (Challiss et al., 1990; Ramamurthy et al., 2001).

A literatura revela explicitamente que esta modalidade de treinamento tem a capacidade de aumentar a massa e a força muscular em humanos e em animais obesos/diabéticos. Castaneda et al. (2002) demonstrou um aumento de 33% na força muscular após submeter pacientes diabéticos a um programa de exercício resistido progressivo de 16 semanas. Resultados similares foram reportados por Dunstan et al. (2002), que documentou um aumento de 42% de força nos membros superiores e 28% nos inferiores. Mais recentemente Larose et al. (2010) observaram um aumento de 65% da força dos músculos extensores do joelho e 57% de incremento nos músculos peitorais após 6 semanas de treino resistido progressivo em uma amostra de 251 participantes portadores de DMT2. Já em modelos animais, com o mesmo protocolo utilizado por nosso estudo, Hornberger e Farrar (2004) observaram um aumento de 23% da força do músculo flexor longo do hálux, com concomitante aumento de 24% de proteínas miofibrilares após treinar ratos Sprague-Dawley saudáveis por 8 semanas. E finalmente, Leite et al. (2013), após expor ratos Wistar à dieta hiperlipídica e realizar treinamento resistido de escalado por 12 semanas, demonstram uma diferença significativa 14% a mais de massa livre de gordura nos animais obesos treinados com exercício resistido, em comparação com os animais obesos sedentários.

Vale lembrar que, devido ao quadro da obesidade, a capacidade oxidativa do músculo esquelético possivelmente encontra-se alterada. Estudos trazem que a lipotoxicidade, em casos de obesidade/DMT2, pode afetar a capacidade oxidativa do músculo esquelético de várias formas. Dentre elas: limitação da enzima carnitina palmitoil-transferase 1 (CPT1) (Brøns e Vaag, 2009), diminuição da atividade das enzimas NADH:O₂ oxirredutase e citrato sintase (Kelley et al., 2002) e diminuição da

atividade da succinato desidrogenase (SDH) com concomitante aumento da lactado desidrogenase (LDH) (Oberbach et al., 2006). Estas informações reforçam o papel do treinamento resistido sobre o metabolismo lipídico no músculo. E que esses efeitos podem, em consequência, reduzir o tamanho do adipócito. Já que ambos os tecidos muscular e adiposo tem alta capacidade de fazer captação e estocar hidrocarbonetos de múltiplas fontes (gordura, carboidrato e proteína), a relativa distribuição pós-prandial para a gordura ou para o músculo é um ponto determinante do tamanho da célula de gordura. Estudos que inibiram a miostatina no músculo esquelético, consequentemente ativando a miogênese, observaram aumento da massa magra, diminuição do tamanho dos adipócitos, melhora do metabolismo da glicose (Guo et al., 2009), melhora da oxidação de ácidos graxos, do gasto energético, e da conversão do tecido adiposo branco para tecido adiposo marrom (Dong et al., 2010). Baseado nisso, Kuo e Harris (2016) trazem em sua revisão que um balanço energético negativo devido à competição do músculo esquelético por fontes de hidrocarbonetos pode ser um modelo para explicar a redução da gordura em razão do exercício físico.

Outra explicação para a diminuição do gordura corporal induzida pelo treinamento está baseada na melhora do perfil oxidativo do músculo esquelético em razão do modelo de treinamento resistido utilizado neste estudo. Recentemente Lee et al. (2018) demonstraram que o modelo animal de treinamento resistido de escalada pode melhorar o perfil mitocondrial, como também desenvolver hipertrofia do músculo esquelético. Eles observaram, em razão do exercício, aumento da atividade da SDH e da Citocromo c Oxidase (COX), aumento do conteúdo mitocondrial de COXII e Citocromo b (Cytb) e aumento do conteúdo do Coativador Gama de Receptor ativado por Proliferador de Peroxissomo 1-alfa (PCG1 α) e de outras proteínas relacionadas à membrana mitocondrial. A melhora da biogênese mitocondrial e do perfil oxidativo da fibra muscular pode ter melhorado a oxidação de ácidos graxos, e contribuído para a perda de peso e a melhora do acúmulo de gordura após o treinamento resistido nos animais deste presente estudo.

O presente trabalho também avaliou o efeito, sob a resistência à insulina, da continuidade da dieta hiperlipídica por 26 semanas, e do exercício resistido mesmo sem controle de ingesta. Como já esperado, os animais alimentados com dieta hiperlipídica (DIO-N) por 26 semanas continuaram a apresentar um quadro de resistência à insulina quando comparados aos animais de mesma idade, alimentados

com dieta padrão (DP-N). Lembrando que esta alteração já tinha sido encontradas na semana 17 do estudo.

O exercício resistido desempenhou um papel muito importante na melhora da resistência à insulina. Os valores da taxa de decaimento da glicose (kTTI) do grupo obeso treinado (DIO+R) não foram equiparadas ao grupo controle exercício (DP+R) provavelmente porque o grupo obeso continuava sendo alimentado com dieta hiperlipídica. Mesmo sob essas condições, a o kTTI aumentou quando comparado com o grupo obeso não treinado, demonstrando que mesmo sob o efeito da dieta, o exercício resistido altera o perfil metabólico relacionado à captação de glicose e melhora a sensibilidade à insulina.

Evidências trazem que a melhora da captação de glicose em função do exercício pode ocorrer por melhora da via de sinalização molecular da insulina (Di Meo et al., 2017). Para este fator, no músculo esquelético, foram realizadas análises da via por Western Blot. Não foram encontrados prejuízos nos conteúdos totais e fosforilados da Akt e da GSK3 β em razão da dieta hiperlipídica. Vale ressaltar que os músculos foram coletados com os animais em jejum e sem estímulo de insulina. Krisan et al. (2004) e Tang et al. (2014) também não encontraram alteração na via de sinalização de insulina utilizando o mesmo protocolo. Esses resultados podem estar relacionados ao fato de que o tempo de vida ativa e completamente fosforilada da Akt na membrana plasmática é relativamente curto. Uma vez que a Akt é fosforilada, ela pode ser detectada e pode fosforilar outros substratos até duas horas após estimulação (Manning e Toker, 2017). Observa-se, então, na continuidade do trabalho de Krisan et al. (2004), onde eles fizeram perfusão de insulina no membro contralateral ao utilizado anteriormente, e desta vez encontraram importante diminuição da atividade do IRS-1 associado com a PI3K, bem como diminuição da atividade da Akt nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, demonstrando o prejuízo da mesma frente à via de sinalização de insulina do tecido muscular. Os dados apresentados pelo presente estudo não são suficientes para concluir se o tecido muscular esquelético dos animais obesos está resistente à insulina ou não, pois a coleta foi realizada sem o devido estímulo da via (aplicação de insulina). Porém é possível sugerir que sim, já que o TTI demonstrou alteração na resistência à insulina sistêmica frente ao desafio da insulina, e a literatura traz que até 75% da captação de glicose dependente de insulina ocorre no músculo esquelético (Klip e Pâquet, 1990). Outro fator dando suporte à esta análise é que, mesmo frente à altas concentrações de

glicose, acompanhado de um suposto quadro de hiperinsulinemia, a cascata de sinalização da insulina no grupo DIO não está sendo recrutada, demonstrando dessensibilização da via.

Após o treinamento resistido ocorreu aumento da fosforilação da Akt, sem alteração, na fosforilação da GSK3 β , nos animais obesos. É difícil comparar esses resultados com outras investigações pois, até o momento, não foram encontradas muitas publicações que detalhem o modelo de exercício resistido utilizado neste trabalho e os componentes da cascata de sinalização da insulina no músculo esquelético. Os trabalhos que mais se aproximam são os de Tang et al. (2014) e de Krisan et al. (2004). Este último utiliza protocolo de exercício de resistência em um aparato de agachamento, onde não há o deslocamento do animal, fator este que difere muito e pode interferir na comparação dos resultados. Já os resultados de Tang et al. (2014) corroboram com o do presente estudo. Com o protocolo de escalada, foi encontrado aumento da fosforilação da Akt Ser⁴⁷³, como também da PI3K Tyr⁴⁵⁸, aumento conteúdo de GLUT4, porém sem alteração do conteúdo de receptores de insulina (INSR), e da fosforilação da GSK3 β Ser⁹. Já em estudo avaliando o exercício resistido em humanos, Deldicque et al. (2008) observaram, através de biópsia do músculo vasto lateral, que o exercício de resistência de alta intensidade inibe a fosforilação da Akt Ser⁴⁷³ logo após o treinamento (30 segundos), e não sofre alteração em um prazo de 24 horas.

A inibição da via da insulina no pós-treino imediato está relacionada aumento da adrenalina e do cortisol decorrentes do exercício e seus efeitos em manter as concentrações de glicose plasmática. Estes são responsáveis pelo aumento da liberação de glucagon, e diminuição da insulina (Howlett et al., 1999). Por isso, vias de captação de glicose não dependentes de insulina devem ser ativadas e modulada, como a da AMPK (O'Neill, 2013). Esta via também foi avaliada no presente trabalho.

Primeiramente, o exercício foi capaz de aumentar de forma expressiva a fosforilação da AMPK α Thr¹⁷². Barbosa et al. (2016), utilizando o mesmo protocolo de exercício resistido de escalada, encontraram os mesmos resultados em ratas Wistar fêmeas. Da mesma forma, o grupo DIO+R, que continuava sendo alimentado com dieta hiperlipídica, também teve a fosforilação da AMPK α aumentada. Não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizaram o protocolo de exercício em questão com avaliação do conteúdo total e fosforilado da AMPK em animais obesos. A AMPK é comumente ativada em situações de privação nutricional, e com a aumento da razão

AMP:ATP, que ocorre durante o exercício (Di Meo et al., 2017). A prolongada exposição ao excesso de glicose, ceramidas e DAG provenientes da lipotoxicidade, são fatores que diminuem a atividade da AMPK (Coughlan et al., 2015). Tomados em conjunto, podemos supor que mesmo frente ao consumo excessivo de gordura, o exercício resistido foi capaz de controlar os valores glicêmicos, melhorar a oxidação dos ácidos graxos, diminuindo assim a lipotoxicidade do músculo esquelético, melhorar a sensibilidade da insulina e modular sua via de sinalização, permitindo um bom ambiente celular para ativação da AMPK frente ao exercício, melhorando ainda mais a captação de glicose independente de insulina.

A última molécula avaliada no tecido muscular, envolvida na captação de glicose, foi a Rac1. Essa relação se dá em razão do remodelamento do citoesqueleto de actina realizado pela via da Rac1, que dá suporte para a translocação do GLUT4, e conseqüente captação da glicose (Marko e Shamshoum, 2018). No presente estudo, o exercício físico foi capaz de aumentar a expressão do mRNA da Rac1 tanto em situação de controle de ingesta, como frente ao consumo da dieta hiperlipídica. Estudos demonstram que a via de sinalização da Rac1 é disfuncional em quadros de resistência à insulina (SyLOW et al., 2014), e que a molécula se mostrou uma importante reguladora da translocação do GLUT4 e da captação de glicose estimuladas pelo exercício aeróbico (SyLOW et al., 2016). Sobre o aumento da expressão da Rac1 no grupo DIO-N, não foram encontrados artigos relacionados ao aumento da atividade/expressão desta molécula com a translocação do GLUT4 e quadros de obesidade e/ou dieta hiperlipídica. Porém, a Rac1, por ser uma proteína G sinalizadora (mais especificamente uma GTPase), também está envolvida em outros processos, como a ativação da NADPH oxidase. Bedard e Krause (2007) trazem em sua revisão sobre as isoformas da NADPH oxidase que, como parte da ativação do complexo proteico, é necessário a interação de uma proteína GTPase Rac com subunidade NOX2, e que a isoforma Rac1 é distribuída de forma universal por todos os tecidos. Como veremos a seguir ambos os grupos DP+R e DIO+R não se encontram com processo inflamatório e quadro de estresse oxidativo presentes, diferente do grupo DIO-N. Por isso supõe-se que o aumento da expressão da Rac1 nos dois primeiros grupos esteja relacionado ao exercício resistido e à melhora da translocação do GLUT4 e da captação da glicose, resultados estes já acompanhados em outros testes. Já o aumento do mRNA da Rac1 no grupo DIO-N provavelmente

está relacionado ao aumento da expressão da NADPH oxidase, como veremos a seguir.

Outro item de relevância avaliado neste trabalho foi o perfil inflamatório do tecido muscular esquelético. Como já bem detalhado ao longo deste trabalho, o acúmulo excessivo de gordura, e principalmente a hipertrofia do adipócito, é um dos principais fatores que desencadeia o processo inflamatório crônico na obesidade (Maury e Brichard, 2010). Winkler et al. (2003) demonstraram a presença de TNF- α em ambas gorduras subcutânea e visceral de paciente com obesidade associada a uma resposta normal ao teste de tolerância à glicose, quando comparado com indivíduos magros. Também foi encontrada uma concentração aumentada de TNF- α e do receptor-2 solúvel de TNF- α no soro dos pacientes obesos, e uma correlação positiva destes fatores com o volume do adipócito de ambos os locais avaliados. Para demonstrar a relação da secreção desta adipocina com o tecido muscular esquelético, Saghizadeh et al. (1996) avaliaram a expressão de TNF através de biópsia muscular de 15 indivíduos obesos com sensibilidade à insulina em resposta à técnica de *clamp* hiperinsulinêmico-euglicêmico. A expressão de TNF foi quatro vezes maior nos indivíduos diabéticos, do que nos pacientes sensíveis à insulina. Estes dados vão ao encontro com o aumento de citocinas no tecido muscular dos animais obesos deste estudo. Ambos TNF- α e IL1 β foram aumentadas em razão da dieta hiperlipídica. Relembrando resultados já discutidos, o exercício resistido foi capaz de controlar/diminuir o peso corporal total, bem como controlar de acúmulo de gordura e restaurar o quadro de resistência à insulina sistêmica. Associado a estes resultados, o treinamento resistido foi capaz de diminuir TNF- α e IL1 β no músculo quando comparado a um aumento ocorrido no grupo obeso. Tang et al. (2016) também encontraram aumento de citocinas pró-inflamatórias no soro de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Ambos TNF- α e IL-6 apresentavam níveis aumentados que foram significativamente reduzidos pelo treinamento resistido.

As principais vias ativadas pelo TNF- α incluem caspases, NF κ B e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK's). As MAPK's ativadas transformam o estímulo externo em respostas fisiológicas pela fosforilação de substratos *downstream*, incluindo fatores de transcrição, proteínas do citoesqueleto, proteínas envolvidas na tradução do mRNA e outras proteínas quinases que contribuem para a especificidade, diversidade e amplificação da cascata (Sabio e Davis, 2014). Sadeghi et al. (2017), em cultura de células de camundongos C2C12 expostas à 0,5mM de

palmitato (12h), demonstram aumento da fosforilação da JNK e da ERK1/2 acompanhado do aumento da expressão de TNF- α . Brown et al (2017) não observaram alteração na fosforilação da ERK em ratos Zucker obesos (*fa/fa*) sedentários, e nem em obesos treinados com exercício de resistência com protocolo de agachamento. Estes resultados corroboram em partes com os dados do presente estudo onde não foi encontrada alteração da expressão gênica de ERK1, porém a dieta hiperlipídica foi capaz de aumentar ao mRNA da JNK1 nos animais obesos.

O papel da JNK e sua relação com a obesidade já está muito bem definido na literatura (Hirosumi et al., 2002; Solinas e Karin, 2010; Solinas e Becattini, 2017), porém a influência do exercício resistido na modulação molecular e gênica desta via ainda é pouco esclarecida. No presente trabalho, o exercício resistido, sob condições de dieta padrão, diminuiu a expressão da JNK, enquanto a associação do treinamento com a dieta hiperlipídica manteve aumentada a expressão gênica da molécula. Estes dados corroboram com os apresentados em estudo indução de síndrome metabólico por dieta rica em frutose, onde não houve alteração da fosforilação da JNK em animais sedentários e obesos (Botezelli et al., 2016). Já outros estudos demonstram que o estresse mecânico no músculo esquelético leva ao aumento da fosforilação da JNK, e esta pode ser responsável pela modulação da via de regulação transcricional da IL-6, interleucina que no tecido muscular exerce um papel benéfico na sensibilização da insulina (Whitham et al., 2012). A contração muscular também pode modular a JNK e iniciar o crescimento muscular via fosforilação do fator de transcrição, o SAMD2, em resíduos da região de ligação específica que levam à inibição do supressor de crescimento, miostatina (Lessard et al., 2018). Como as evidências são controversas, mais análises são necessárias para explicar a diferença da expressão da JNK entre os grupos exercitados que consumiram dieta padrão ou dieta hiperlipídica, uma vez que o exercício ajuda a diminuir e controlar quadros de inflamação exacerbados por ativação da via da JNK (Botezelli et al., 2016), mas também parece ter efeito sobre um dos principais efeitos benéficos para a obesidade, o crescimento muscular (Whitham et al., 2012; Lessard et al., 2018).

Mudanças no perfil redox do músculo em condições de obesidade tem sido observado em diferentes estudos (Kim et al., 2006; Dokken et al., 2008; Pinho et al., 2017), porém a relação destas mudanças com a resistência à insulina ainda é inconclusiva e parece estar intimamente associado aos níveis de ERO presentes nos ambientes celulares. Níveis fisiológicos de ERO são de extrema importância para a

inibição das PTP's, fosfatases que desfosforilam a PIP3 bloqueando a sinalização da PI3K (Rhee, 2006; Tonks, 2006); porém o desequilíbrio no estado redox da célula, onde a produção de ERO supera a capacidade antioxidante do tecido, pode levar a danos oxidativos em proteínas, lipídeos e DNA (D'Autréaux e Toledano, 2007), como também à alteração nas via metabólicas de sinalização com consequente agravo a sensibilidade à insulina do tecido muscular (Henriksen et al., 2011; Henriksen, 2013).

Evidências em humanos tem demonstrado uma associação direta entre marcadores plasmáticos de estresse oxidativo e, danos relacionados com a resistência à insulina (Paolisso et al., 1994; Nourooz-Zadeh et al., 1997). Outros trabalhos também já demonstram a relação do estresse oxidativo no tecido adiposo e como este quadro pode influenciar outros órgãos e tecido (revisão de Matsuda e Shimomura, 2013). Embora o aumento da presença de ERO deste estudo não tenha sido estatisticamente significativo ($p < 0,093$), o aumento de 58% da oxidação do DCFH nos animais alimentados com dieta hiperlipídica pode apresentar importância suficiente para promover alterações na biologia redox, pois pequenas concentrações de ERO já produzem alterações celulares (Kim et al., 2006). Este resultado também veio acompanhado de uma diminuição significativa das enzimas de defesas antioxidantes, a SOD e a CAT. Esses resultados podem estar relacionados com a quantidade de gordura ingerida pelo o período experimental. Isso porque a exposição crônica à ácidos graxos de cadeia longa, pode aumentar a produção de ERO de origem mitocondrial, o que está associada com concomitante dano em DNA mitocondrial, disfunção mitocondrial, bem como indução de resistência à insulina por ativação da JNK (Yuzefovych et al., 2010). Outro fator pode decorrer de um aumento da expressão gênica de subunidades da NADPH oxidase, também observado neste trabalho. Resultados similares foram encontrado por Figueiredo et al., (2015), onde o aumento da produção de ERO no tecido muscular, em um quadro de resistência à insulina induzida por dieta, foi consequência da ativação/aumento da expressão da NOX2, sendo que o nocaute da mesma, protegeu contra os efeitos deletérios da dieta.

No sentido de avaliar os efeitos do exercício sobre as alterações redox da célula, foi observado que o treinamento resistido foi capaz de reverteu o aumento da oxidação do DCFH, e restaurar a atividade da SOD e da CAT, mesmo sob a continuidade da dieta hiperlipídica. Os resultados positivos do exercício resistido estão possivelmente associados com a capacidade do exercício em promover uma modulação dos sistemas antioxidantes para além da atividade de enzimas

antioxidantes primárias como SOD e CAT. Um dos mecanismos que pode ser mediados pelo exercício resistido é a translocação do *Fator Nuclear Eritroide 2 – tipo 2* (NRF2) para o núcleo e promover a expressão diversas enzimas antioxidantes como NADPH Quinona Oxirredutase 1 (NQO1) e Heme Oxigenase 1 (HO1), que ajudam a detoxificar o sistema biológico e contribuir para a redução do estresse oxidativo (Done e Traustadóttir, 2016).

Analisando a expressão da NADPH oxidase sob a influência do exercício resistido, este imprimiu aumento na expressão das subunidades avaliadas sob condições de dieta padrão, com exceção da gp91^{phox}. Mesmo que este aumento tenha se equiparado ao aumento da expressão da NADPH oxidase em razão da dieta hiperlipídica, vale ressaltar que esta alteração causada pelo exercício não está acompanhada de um desequilíbrio do estado redox da célula. Com isso pode-se supor que esta alteração não está relacionada à instalação de um quadro de estresse oxidativo, e sim a um aumento da expressão da NADPH oxidase relacionado a uma melhora do processo de “explosão respiratória”, levando a uma resposta imune mais eficiente. Levada-Pires et al. (2007), através de treinamento em esteira, encontraram resultados similares em neutrófilos obtidos através de lavagem intraperitoneal, e Sakellariou et al. (2014), em revisão de literatura, concluíram que a NADPH oxidase é uma das principais geradoras de superóxido durante a contração do músculo esquelético. Por fim, vale lembrar que níveis fisiológicos de ERO trazem benefícios à sensibilidade da insulina em pacientes saudáveis (Loh et al., 2009), e que a geração de ERO, induzida pela contração, também tem demonstrado desempenhar uma importante função fisiológica na regulação da produção de força muscular e das respostas adaptativas induzidas pela contração das fibras musculares ao treinamento físico (Powers et al., 2011). Exemplo disso é o aumento do cálcio intracelular mediado por receptores inositol 1,4,5-trifosfato, em razão da produção de ERO proveniente da NADPH oxidase demonstrando por Espinosa et al. (2009).

Como visto, o aumento da NADPH oxidase poder ser tanto benéfico quanto trazer maiores danos oxidativos à célula. Avaliando o efeito do exercício resistido deste estudo, associado à dieta hiperlipídica, observou-se que o grupo obeso treinado apresentou aumento da expressão das subunidades da enzima tanto quanto o grupo treinado dieta padrão, e o grupo obeso não treinado (na relação vezes em relação ao DP-N). A fim de avaliar se este aumento está associado aos efeitos deletérios da dieta hiperlipídica, ou aos efeitos benéficos do exercício, o cruzamento com os resultados

bioquímicos de estresse oxidativo foram analisados. Levando em consideração que o grupo obeso treinado (DIO+R) apresentou os mesmos padrões de oxidação de DCFH, atividade da SOD e da CAT que o grupo treino resistido + dieta padrão (DP+R), pode-se supor que não existe desequilíbrio do balanço redox no tecido muscular deste animais, e portanto o aumento da NADPH oxidase no grupo DIO+R é em função dos efeitos benéficos do exercício resistido, tanto que em todas as subunidades o comportamento entre esses dois grupos foram iguais. Para melhor elucidar o papel da NADPH oxidase no exercício resistido, mais dados e estudos são necessários.

6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, nossos resultados demonstraram um importante efeito do exercício resistido sobre o controle/estabilização do peso corporal e no acúmulo de gordura corporal. Também foi observado um importante controle/redução no diâmetro do adipócito, que como demonstra a literatura, é uma das características do tecido adiposo branco que desencadeiam o processo inflamatório que leva à resistência à insulina. Associado à melhora desses processos, o exercício resistido foi também capaz de melhorar a sensibilidade à insulina, controlar a glicemia de jejum revertendo assim o quadro de resistência à insulina observado prévio ao início do protocolo de treinamento. Vale ressaltar que a melhora de todos esses processos ocorreu mesmo sem controle de ingesta. Ou seja, os animais continuavam sob os efeitos maléficos da ingesta da dieta hiperlipídica, o que demonstra um efeito ainda mais promissor do exercício frente ao quadro de obesidade.

Para além dos resultados clínicos, este trabalho foi um dos primeiros a demonstrar, em um único estudo, a influência do exercício resistido associado ao modelo de obesidade e sua relação com: o tecido muscular esquelético e a via molecular e gênica de captação de glicose dependente e independente de insulina, parâmetros de estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios. Também traz sua relação com a modulação de alguns parâmetros de danos genotóxicos em sangue e fígado. Ficou demonstrado que existe uma importante alteração do perfil histológico do tecido muscular frente ao modelo de obesidade, com aparente hipotrofia muscular e centralização de núcleo. Esse é um importante déficit encontrado na obesidade pois traz consequências funcionais aos pacientes portadores de DM2. Este trabalho corroborou com a literatura demonstrando que essas alterações podem ter ocorrido em função da alteração do metabolismo da captação de glicose, em razão da resistência à insulina sistêmica observada no TTI, a alteração do estado redox do músculo esquelético, bem como aumento dos níveis de citocinas inflamatórias como TNF α e IL1 β . Porém, mais estudos são necessários para melhor elucidar o papel da ERO na sinalização de insulina e no processo de obesidade.

Já o exercício resistido foi capaz de melhorar o perfil molecular da via de captação de glicose através do aumento da fosforilação da Akt Ser⁴⁷³ e da AMPK Thr¹⁷², o que pode ter auxiliado diretamente a melhora da resistência à insulina instalada pela obesidade por melhorar a captação de glicose pelas células

musculares. Como também houve aumento da expressão da Rac1, molécula que auxilia na organização dos filamentos de actina da célula para translocação do GLUT4, pode-se supor que este tenha sido outra via ativada pelo exercício para a captação de glicose, mas para confirmar estes dados mais estudo sobre associando este resultado e a translocação do GLUT4, e a presença da vesícula na membrana plasmática, são necessários. O exercício resistido também foi eficiente em reequilibrar o balanço redox do tecido muscular, aumentando/restaurando a atividade da SOD e da CAT, bem como controlar os níveis exacerbados de citocinas inflamatórias gerados em função do processo de obesidade/resistência à insulina. Como as análises bioquímicas e moleculares foram feitas somente ao final do estudo, não se pode afirmar se o exercício protegeu contra os danos da dieta hiperlipídica, ou se os reverteu, pois, as mesmas análises não foram realizadas ao final do protocolo de indução de obesidade e previamente ao início do exercício. Para melhor entendimento deste processo, estudo futuros adotando esta metodologia são necessários.

Desta forma, os resultados deste estudo demonstram que o exercício resistido, além dos benefícios já conhecidos de aumento de massa e da resistência muscular, pode ser um grande aliado no processo de saúde relacionado à abordagem terapêutica da obesidade, principalmente na melhora da sensibilidade à insulina e da captação da glicose, processos relacionados à resistência à insulina, uma das principais comorbidades vinculando a obesidade e a DM2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

ABESO. Diretrizes Brasileiras de Obesidade - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. São Paulo, SP: Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/uploads/downloads/92/57fcc403e5da.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

Aebi H. Oxygen Radicals in Biological Systems: Catalase in Vitro. "In": Packer L, editor. *Methods in Enzymol: Oxygen Radicals in Biological Systems*. 1984; 105(1947): 121–126.

Akhmedov D, Berdeaux R. The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Frontiers in Physiology*. 2013; 4(371): 1–12.

Archuleta TL, Lemieux AM, Saengsirisuwan V, Teachey MK, Lindborg K a., Kim JS, Henriksen EJ. Oxidant stress-induced loss of IRS-1 and IRS-2 proteins in rat skeletal muscle: Role of p38 MAPK. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(10): 1486–1493.

Arner P. Human fat cell lipolysis: Biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005; 19(4): 471–482.

Aroor AR, DeMarco VG. Oxidative stress and obesity: The chicken or the egg? *Diabetes*. 2014; 63(7): 2216–2218.

Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, Wasserman DH, McGuinness OP. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech*. 2010; 3(9–10): 525–534.

Bacchi E, Negri C, Zanolin ME, Milanese C, Faccioli N, Trombetta M, Zoppini G, Cevese A, Bonadonna RC, Schena F, Bonora E, Lanza M, Moghetti P. Metabolic

Effects of Aerobic Training and Resistance Training in Type 2 Diabetic Subjects: A randomized controlled trial (the RAED2 study). *Diabetes Care*. 2012; 35(4): 676–682.

Bahnson JL, Knowler WC, Bantle JP, Bertoni AG, Bray GA, Chen H, Cheskin L, Clark JM, Egan C, Evans M, Foreyt JP, Glasser SP, Greenway FL, Gregg EW, Hazuda HP, Hill JO, Horton ES, Hubbard VS, Jakicic JM, Jeffery RW, Johnson KC, Kahn SE, Kitabchi AE, Korytkowski M, Krakoff J, Kure A, Lewis CE, Maschak-Carey BJ, Michaels S, Montez MG, Nathan DM, Nyenwe E, Patricio J, Peters A, Pi-Sunyer X, Pownall H, Wadden TA, Wagenknecht LE, Williamson DF, Wing RR, Wyatt H, Yanovski SZ. Effect of a long-term behavioural weight loss intervention on nephropathy in overweight or obese adults with type 2 diabetes: A secondary analysis of the Look AHEAD randomised clinical trial. *The Lancet Diabetes and Endocrinol*. 2014; 2(10): 801–809.

Banitalebi E, Kazemi AR, Faramarzi M, Nasiri S, Haghghi MM. Effects of sprint interval or combined aerobic and resistance training on myokines in overweight women with type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Life Sciences*. 2019; 217: 101–109.

Barbieri E, Sestili P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct*. 2012; 2012(982794): 1-17.

Barbosa MR, Shiguemoto GE, Tomaz LM, Ferreira FC, Rodrigues MFC, Domingues MM, Souza Master MVC, Canevazzi GHR, Silva-Magosso NS, Selistre-De-Araujo HS, Perez SE. Resistance Training and Ovariectomy: Antagonic Effects in Mitochondrial Biogenesis Markers in Rat Skeletal Muscle. *Int J Sports Exerc Med*. 2016; 37(11): 841–848.

Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007; 87: 245–313.

Benito M. Tissue specificity on insulin action and resistance: Past to recent mechanisms. *Acta Physiol*. 2011; 201(3): 297–312.

Bhavsar N, St-Onge MP. The diverse nature of saturated fats and the case of medium-chain triglycerides: How one recommendation may not fit all. *Curr Opin Clin Nutr*

Metab Care. 2016; 19(2): 81–87.

Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009; 117(6): 241–250.

Boucher J, Kleinridders A, Kahn R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistance States. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 6(a009191): 1–23.

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

Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res*. 2005; 65(1): 16–27.

Brøns C, Vaag A. Skeletal muscle lipotoxicity in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Physiol*. 2009; 587(16): 3977–3978.

Brown JL, Rosa-Caldwell ME, Lee DE, Brown LA, Perry RA, Shimkus KL, Blackwell TA, Fluckey JD, Carson JA, Dridi S, Washington TA, Greene NP. PGC-1 α gene expression is suppressed by the IL-6—MEK—ERK 1/2 MAPK signalling axis and altered by resistance exercise, obesity and muscle injury. *Acta Physiol*. 2017; 220(2): 275–288.

Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley G, Wittwer CT, Schjerling P, Day PJ, Abreu M, Aguado B, Beaulieu JF, Beckers A, Bogaert S, Browne JA, Carrasco-Ramiro F, Ceelen L, Ciborowski K, Cornillie P, Coulon S, Cuyper A, De Brouwer S, De Ceuninck L, De Craene J, De Naeyer H, De Spiegelaere W, Deckers K, Dheedene A, Durinck K, Ferreira-Teixeira M, Fieuw A, Gallup JM, Gonzalo-Flores S, Goossens K, Heindryckx F, Herring E, Hoenicka H, Icardi L, Jaggi R, Javad F, Karampelias M, Kibenge F, Kibenge M, Kumps C, Lambert I, Lammens T, Markey A, Messiaen P, Mets E, Morais S, Mudarra-Rubio A, Nakiwala J, Nelis H, Olsvik PA, Pérez-Novo C, Plusquin M, Remans T, Rihani A, Rodrigues-Santos P, Rondou P, Sanders R, Schmidt-Bleek K,

Skovgaard K, Smeets K, Tabera L, Toegel S, Van Acker T, Van Den Broeck W, Van Der Meulen J, Van Gele M, Van Peer G, Van Poucke M, Van Roy N, Vergult S, Wauman J, Tshuikina-Wiklander M, Willems E, Zaccara S, Zeka F, Vandesompele J. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods*. 2013; 10(11): 1063–1067.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55(4): 611–622.

Capehorn MS, Haslam DW, Welbourn R. Obesity Treatment in the UK Health System. *Curr Obes Rep*. 2016; 5(3): 320–326.

Castaneda C, Layne JE, Munoz-Orians L, Gordon PL, Walsmith J, Foldvari M, Roubenoff R, Tucker KL, Nelson ME. A Randomized Controlled Trial of Resistance Exercise Training to Improve Glycemic Control in Older Adults With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2002; 25(12): 2335–2341.

Catalán V, Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J. Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Skeletal Muscle of Obese Subjects. "In": del Moral AM, Aguilera CM, editores. *Obesity: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. 1ª ed. Academic Press. 2018, capítulo 8. p. 163–189.

CDC. Center for Disease Control and Prevention (EUA). Adult Obesity Causes & Consequences. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/obesity/adult/causes.html>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

Cefalu WT. Insulin resistance: cellular and clinical concepts. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001; 226(1): 13–26.

Challiss R, Blackledge MJ, Radda GK. Spatially resolved changes in diabetic rat skeletal muscle metabolism in vivo studied by ³¹P-n.m.r. spectroscopy. *Biochem J*. 1990; 268: 111–115.

Cherrington AD, Moore MC, Sindelar DK, Edgerton DS. Insulin action on the liver *in vivo*. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(5): 1171–1174.

Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol*. 2016; 7(30): 1–16.

Church TS, Blair SN, Cocroham S, Johannsen N, Johnson W, Kramer K, Mikus CR, Myers V, Nauta M, Rodarte RQ, Sparks L, Thompson A, Earnest CP. Effects of Aerobic and Resistance Training on Hemoglobin A_{1c} Levels in Patients With Type 2 Diabetes. *Jama*. 2010; 304(20): 2253-2262.

Codella R, Ialacqua M, Terruzzi I, Luzi L. May the force be with you: why resistance training is essential for subjects with type 2 diabetes mellitus without complications. *Endocrine*. 2018; 62(1): 14–25.

Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, Saha AK. Nutrient Excess in AMPK Downregulation and Insulin Resistance. *J Endocrinol Diabetes Obes*. 2015; 1(1): 1008-.

D'Aur aux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(10): 813–824.

Da Luz G, Frederico MJS, Da Silva S, Vitto MF, Cesconetto PA, De Pinho RA, Pauli JR, Silva ASR, 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(9): 2015–2023.

Da Silva MF, Natali AJ, Da Silva E, Gomes GJ, Teodoro BG, Cunha DNQ, Drummond LR, Drummond FR, Moura AG, Belfort FG, De Oliveira A, Maldonado IRSC, Alberici LC. Attenuation of Ca²⁺ homeostasis, oxidative stress, and mitochondrial dysfunctions in diabetic rat heart: insulin therapy or aerobic exercise? *J Appl Physiol*. 2015; 119(2): 148–156.

Dehghan M, Mente A, Zhang X, Swaminathan S, Li W, Mohan V, Iqbal R, Kumar R, Wentzel-Viljoen E, Rosengren A, Amma LI, Avezum A, Chifamba J, Diaz R, Khatib R, Lear S, Lopez-Jaramillo P, Liu X, Gupta R, Mohammadifard N, Gao N, Oguz A, Ramli AS, Seron P, Sun Y, Szuba A, Tsolekile L, Wielgosz A, Yusuf R, Hussein Yusufali A, Teo KK, Rangarajan S, Dagenais G, Bangdiwala SI, Islam S, Anand SS, Yusuf S, Diaz R, Orlandini A, Linetsky B, Toscanelli S, Casaccia G, Cuneo JM, Rahman O, Yusuf R, Azad AK, Rabbani KA, Cherry HM, Mannan A, Hassan I, Talukdar AT, Tooheen RB, Khan MU, Sintaha M, Choudhury T, Haque R, Parvin S, Avezum A, Oliveira GB, Marcilio CS, Mattos AC, Teo K, Yusuf S, Dejesus J, Agapay D, Tongana T, Solano R, Kay I, Trottier S, Rimac J, Elsheikh W, Heldman L, Ramezani E, Dagenais G, Poirier P, Turbide G, Auger D, De Bluts ALB, Proulx MC, Cayer M, Bonneville N, Lear S, Gasevic D, Corber E, De Jong V, Vukmirovich I, Wielgosz A, Fodor G, Pipe A, Shane A, Lanas F, Seron P, Martinez S, Valdebenito A, Oliveros M, Wei L, Lisheng L, Chunming C, Xingyu W, Wenhua Z, Hongye Z, Xuan J, Bo H, Yi S, Jian B, Xiuwen Z, Xiaohong C, Tao C, Hui C, Xiaohong C, Qing D, Xiaoru C, Qing D, Xinye H, Bo H, Xuan J, Jian L, Juan L, Xu L, Bing R, Yi S, Wei W, Yang W, Jun Y, Yi Z, Hongye Z, Xiuwen Z, Manlu Z, Fanghong L, Jianfang W, Yindong L, Yan H, Liangqing Z, Baoxia G, Xiaoyang L, Shiyong Z, Rongwen B, Xiuzhen T, Dong L, Di C, Jianguo W, Yize X, Tianlu L, Peng Z, Changlin D, Ning L, Xiaolan M, Yuqing Y, Rensheng L, Minfan F, Jing H, Yu L, Xiaojie X, Qiang Z, Lopez-Jaramillo P, Lopez PC, Garcia R, Jurado LJA, Gómez-Arbeláez D, Arguello JF, Dueñas R, Silva S, Pradilla LP, Ramirez F, Molina DI, Cure-Cure C, Perez M, Hernandez E, Arcos E, Fernandez S, Narvaez C, Paez J, Sotomayor A, Garcia H, Sanchez G, David T, Rico A, Mony P, Vaz M, Bharathi A V., Swaminathan S, Kurpad KSA, Jayachitra KG, Kumar N, Hospital HAL, Mohan V, Deepa M, Parthiban K, Anitha M, Hemavathy S, Rahulashankiruthiyayan T, Anitha D, Sridevi K, Gupta R, Panwar RB, Mohan I, Rastogi P, Rastogi S, Bhargava R, Kumar R, Thakur JS, Patro B, Lakshmi PVM, Mahajan R, Chaudary P, Kutty VR, Vijayakumar K, Ajayan K, Rajasree G, Renjini AR, Deepu A, Sandhya B, Asha S, Soumya HS, Kelishadi R, Bahonar A, Heidari H, Yusoff K, Ismail TST, Ng KK, Devi A, Nasir NM, Yasin MM, Miskan M, Rahman EA, Arsad MKM, Ariffin F, Razak SA, Majid FA, Bakar NA, Yacob MY, Zainon N, Salleh R, Ramli MKA, Halim NA, Norlizan SR, Ghazali NM, Arshad MN, Razali R, Ali S, Othman HR, Hafar CWJCW, Pit A, Danuri N, Basir F, Zahari SNA, Abdullah H, Arippin MA, Zakaria NA, Noorhassim I, Hasni MJ, Azmi MT, Zaleha MI, Hazdi KY, Rizam AR, Sazman W, Azman A, Khatib R, Khammash U, Khatib

A, Giacaman R, Iqbal R, Afridi A, Khawaja R, Raza A, Kazmi K, Zatonski W, Szuba A, Zatonska K, Ilow R, Ferus M, Regulska-Ilow B, Rózanska D, Wolyniec M, Alkamel, Ali M, Kruger MA, Voster HH, Schutte AE, Wentzel-Viljoen E, Eloff FC, De Ridder H, Moss H, Potgieter J, Roux AA, Watson M, De Wet G, Olckers A, Jerling JC, Pieters M, Hoekstra T, Puoane T, Igumbor E, Tsolekile L, Sanders D, Naidoo P, Steyn N, Peer N, Mayosi B, Rayner B, Lambert V, Levitt N, Kolbe-Alexander T, Ntyintyane L, Hughes G, Swart R, Fourie J, Muzigaba M, Xapa S, Gobile N, Ndayi K, Jwili B, Ndibaza K, Egbujie B, Rosengren A, Boström KB, Gustavsson A, Andreasson M, Snällman M, Wirdemann L, Oguz A, Imeryuz N, Altuntas Y, Gulec S, Temizhan A, Karsidag K, Calik KBT, Akalin AAK, Caklili OT, Keskinler M V., Erbakan AN, Yusufali AM, Almahmeed W, Swidan H, Darwish EA, Hashemi ARA, Al-Khaja N, Muscat-Baron JM, Ahmed SH, Mamdouh TM, Darwish WM, Abdelmotagali MHS, Awed SO, Movahedi GA, Hussain F, Al Shaibani H, Gharabou RIM, Youssef DF, Nawati AZS, Salah ZA, Abdalla RFE, Al Shuwaihi SM, Al Omairi MA, Cadigal OD, Alejandrino RS, Chifamba J, Gwaunza L, Terera G, Mahachi C, Murambiwa P, Machiweni T, Mapanga R. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet*. 2017; 390(4): 2050–2062.

Deldicque L, Atherton P, Patel R, Theisen D, Nielens H, Rennie MJ, Francaux M. Decrease in Akt/PKB signalling in human skeletal muscle by resistance exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2008; 104(1): 57–65.

Denham J, O'Brien BJ, Charchar FJ. Telomere Length Maintenance and Cardio-Metabolic Disease Prevention Through Exercise Training. *Sports Med*. 2016; 46(9): 1213–1237.

Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. *J Endocrinol*. 2017a; 234(3): R159–R181.

Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Skeletal muscle insulin resistance: Role of mitochondria and other ROS sources. *J Endocrinol*. 2017b; 233(1): R15–R42.

Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294(3): E615–E621.

Done AJ, Traustadóttir T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biol.* 2016; 10: 191–199.

Dong J, Sulik KK, Chen S yu. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicology Lett.* 2010; 193(1): 94–100.

Dube S, Errazuriz I, Cobelli C, Basu R, Basu A. Assessment of insulin action on carbohydrate metabolism: Physiological and non-physiological methods. *Diabet Med.* 2013; 30(6): 664–670.

Dunstan DW, Daly RM, Owen N, Jolley D, De Courten M, Shaw J, Zimmet P. High-Intensity Resistance Training Improves Glycemic Control in Older Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2002; 25(10): 1729–1736.

Eknoyan G. A History of Obesity, or How What Was Good Became Ugly and Then Bad. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2006; 13(4): 421–427.

Engin A. The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. "In": Engin AB; Engin A, editores. *Adv Exp Med Biol: Obesity and Lipotoxicity.* Switzerland: Springer International Publishing, v. 960. p. 161–196.

Eriksson J, Taimela S, Eriksson K, Parviainen S, Peltonen J, Kujala U. Resistance training in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Sports Exerc Med.* 1997; 18(4): 242–246.

Espinosa A, García A, Härtel S, Hidalgo C, Jaimovich E. NADPH oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. *J Biochem Physiol.* 2009; 284(4): 2568–2575.

Farias J, Maggi R, Tromm C, Silva L, Luciano T, Marques S, Lira F, De Souza C, Pinho RA. Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adiponectin/APPL1 protein levels in mice. *Lipids Health Dis.* 2012; 11(134): 1–9.

Farias JM, Bom KF, Tromm CB, Luciano TF, Marques SO, Tuon T, Silva LA, Lira FS, De Souza CT, Pinho RA. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. *Horm Metab Res.* 2013; 45(3): 190–6.

Fediuc S, Gaidhu MP, Ceddia RB. Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *J Lipid Res.* 2006; 47(2): 412–420.

Felber J-P, Golay A. Pathways from obesity to diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26(Suppl 2): S39-45.

Fenster CP, Weinsier RL, Darley-Usmar VM, Patel RP. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: The role of oxidant stress. *Obes Res.* 2002; 10(9): 964–968.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Med Sci.* 2011; 12(5): 3117–3132.

Figueiredo ASP de, Salmon AB, Bruno F, Jimenez F, Martinez HG, Halade G V., Ahuja SS, Clark R a., DeFronzo R, Abboud HE, El Jamali A. Nox2 Mediates Skeletal Muscle Insulin Resistance Induced by a High-Fat Diet. *J Biol Chem.* 2015; 290(21): 13427-13439.

Fiorentino T, Prioletta A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced Oxidative Stress and its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases. *Curr Pharm Des.* 2013; 19(32): 5695–5703.

Folker ES, Baylies MK. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Front Physiol.* 2013; 4(363): 1–10.

Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, Imamura F, Kröger J, Schulze MB, Crowe FL, Huerta JM, Guevara M, Beulens JW, Van Woudenberg GJ, Wang L, Summerhill K, Griffin JL, Feskens EJ, Amiano P, Boeing H, Clavel-Chapelon F, Dartois L, Fagherazzi G, Franks PW, Gonzalez C, Jakobsen MU, Kaaks R, Key TJ, Khaw KT, Kühn T, Mattiello A, Nilsson PM, Overvad K, Pala V, Palli D, Quirós JR, Rolandsson O, Roswall N, Sacerdote C, Sánchez MJ, Slimani N, Spijkerman AM, Tjonneland A, Tormo MJ, Tumino R, Van der A DL, Van der Schouw YT, Langenberg C, Riboli E, Wareham NJ. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: The EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014; 2(10): 810–818.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(3): 847–850.

Fu X, Zhao J-X, Zhu M-J, Foretz M, Viollet B, Dodson M V, Du M. AMP-Activated Protein Kinase $\alpha 1$ but Not $\alpha 2$ Catalytic Subunit Potentiates Myogenin Expression and Myogenesis. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(22): 4517–4525.

Fu X, Zhu M, Zhang S, Foretz M, Viollet B, Du M. Obesity impairs skeletal muscle regeneration through inhibition of AMPK. *Diabetes.* 2016; 65(1): 188–200.

García-Hermoso A, Ramírez-Vélez R, Ramírez-Campillo R, Peterson MD, Martínez-Vizcaíno V. Concurrent aerobic plus resistance exercise versus aerobic exercise alone to improve health outcomes in paediatric obesity: A systematic review and meta-Analysis. *Br J Sports Med.* 2018; 52: 161–166.

Gonzalez E, McGraw TE. Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *PNAS.* 2009; 106(17): 7004–7009.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, Nascimento PC, Pomblum VJ, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43(2): 619–624.

Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O. Myostatin Inhibition in Muscle, but Not Adipose Tissue, Decreases Fat Mass and Improves Insulin Sensitivity. *PLoS ONE.* 2009; 4(3-e4937): 1–11.

Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radical in Biology and Medicine.* 5^a ed. New York, NY: Oxford University Press, 2015.

Haywood C, Sumithran P. Treatment of obesity in older persons-A systematic review. *Obes Rev.* 2019; (November 2018): 1–11.

Henriksen EJ. Effects of H₂O₂ on insulin signaling the glucose transport system in mammalian skeletal muscle. "In": Packer L, editor. *Methods Enzymol. Hydrogen Peroxidase and Cell Signaling.* 1^a ed. Part C: Elsevier Inc., v. 528. p. 269–278.

Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med,* 2011; 51(5): 993–999.
Hermida MA, Dinesh Kumar J, Leslie NR. GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network. *Adv Biol Regul.* 2017; 65: 5–15.

Hidalgo C, Sánchez G, Barrientos G, Aracena-Parks P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S-glutathionylation. *J Biol Chem.* 2006; 281(36): 26473–26482.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Cem ZG, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002; 420(6613): 333–336.

Hornberger T, Farrar R. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol.* 2004; 29(1):

16–31.

Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007; 56(4): 901–911.

Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *N Engl J Med*. 2007; 356(3): 213–215.

Howell S, Kones R. “Calories in, calories out” and macronutrient intake: The Hope, Hype, and Science of Calories. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017; 313: E608–E6012.

Howlett K, Galbo H, Lorentsen J, Bergeron R, Zimmerman-Belsing T, Bülow J, Feldt-Rasmussen U, Kjær M. Effect of adrenaline on glucose kinetics during exercise in adrenalectomised humans. *J Physiol*. 1999; 519(3): 911–921.

Hu FB. Are refined carbohydrates worse than saturated fat? *Am J Clin Nutr*. 2010; 91(6): 1541–1542.

Huang T, Xiao Y, Yi L, Li L, Wang M, Tian C, Ma H, He K, Wang Y, Han B, Ye X, Li X. Coptisine from *Rhizoma Coptidis* Suppresses HCT-116 Cells-related Tumor Growth in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2017; 7(38524): 1–11.

Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H. Protein Kinase C-Dependent Increase in Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Vascular Tissues of Diabetes: Role of Vascular NAD(P)H Oxidase. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: S227–S232.

Irvine C, Taylor NF. Progressive resistance exercise improves glycaemic control in people with type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Aust J Physiother*. 2009; 55(4): 237–246.

Jakobsen MU, Dethlefsen C, Joensen AM, Stegger J, Tjønneland A, Schmidt EB, Overvad K. Intake of carbohydrates compared with intake of saturated fatty acids and risk of myocardial infarction: Importance of the glycemic index¹⁻³. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91(6): 1764–1768.

Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res*. 2007; 32(4–5): 577–95.

Jorge MLMP, De Oliveira VN, Resende NM, Paraiso LF, Calixto A, Diniz ALD, Resende ES, Ropelle ER, Carnevalheira JB, Espindola FS, Jorge PT, Geloneze B. 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*. 2011; 60(9): 1244–1252.

Kelley DE, He J, Menshikova E V, Ritov VB. Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2002; 51: 2944–2950.

Kelley GA, Kelley KS. Impact of progressive resistance training on lipids and lipoproteins in adults: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Prev Med*. 2009; 48(1): 9–19.

Kessler A, Uphues I, Ouwens DM, Till M, Eckel J. Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 α/β subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280: E65–E74.

Kim JS, Saengsirisuwan V, Sloniger JA, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidant stress and skeletal muscle glucose transport: Roles of insulin signaling and p38 MAPK. *Free Radic Biol Med*. 2006; 41(5): 818–824.

Klip A, Pâquet MR. Glucose Transport and Glucose Transporters in Muscle and Their Metabolic Regulation. *Diabetes Care*, 1990; 13(3): 228–243.

Klip A, Sun Y, Chiu TT, Foley KP. Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;

306(10): C879–C886.

Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, Kern M, Stumvoll M, Blüher M. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299(3): 506–515.

Krisan AD, Collins DE, Crain AM, Kwong CC, Singh MK, Bernard JR, Yaspelkis III BB. Resistance training enhances components of the insulin signaling cascade in normal and high-fat-fed rodent skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2004; 96: 1691–1700.

Kuo C-H, Harris MB. Abdominal fat reducing outcome of exercise training: fat burning or hydrocarbon source redistribution? *Can J Physiol Pharmacol.* 2016; 94(7): 695–698.

Larose J, Sigal RJ, Boulé NG, Wells GA, Prud'Homme D, Fortier MS, Reid RD, Tulloch H, Coyle D, Phillips P, Jennings A, Khandwala F, Kenny GP. Effect of exercise training on physical fitness in type II diabetes mellitus. *Med Sci Sports Exerc.* 2010; 42(8): 1439–1447.

LeBrasseur NK, Walsh K, Arany Z. Metabolic benefits of resistance training and fast glycolytic skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 300(1): E3–E10.

Lee H, Kim K, Kim B, Shin J, Rajan S, Wu J, Chen X, Brown MD, Lee S, Park JY. A cellular mechanism of muscle memory facilitates mitochondrial remodelling following resistance training. *J Physiol.* 2018; 596(18): 4413–4426.

Leite RD, Durigan RDCM, De Souza Lino AD, De Souza Campos MV, Souza MDG, Selistre-De-Araújo HS, Bouskela E, Kraemer-Aguiar LG. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism.* 2013; 62(10): 1477–1484.

Leitner DR, Frühbeck G, Yumuk V, Schindler K, Micic D, Woodward E, Toplak H. Obesity and type 2 diabetes: Two diseases with a need for combined treatment strategies - EASO can lead the way. *Obesity Facts.* 2017; 10(5): 483–492.

Lessard SJ, MacDonald TL, Pathak P, Han MS, Coffey VG, Edge J, Rivas DA, Hirshman MF, Davis RJ, Goodyear LJ. JNK regulates muscle remodeling via myostatin/SMAD inhibition. *Nat Commun.* 2018; 9(3030): 1–14.

Levada-Pires AC, Lambertucci RH, Mohamad M, Hirabara SM, Curi R, Pithon-Curi TC. Exercise training raises expression of the cytosolic components of NADPH oxidase in rat neutrophils. *Eur J Appl Physiol.* 2007; 100(2): 153–160.

Levine BRL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, Ahn B. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Protein. Assay and Repair of Biological Damage. "In": *Methods Enzymol.* 1990; 186(1983): 464–478.

Lin F-Y, Chen Y-H, Tasi J-S, Chen J-W, Yang T-L, Wang H-J, Li C-Y, Chen Y-L, Lin S-J. Endotoxin Induces Toll-Like Receptor 4 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells via NADPH Oxidase Activation and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(12): 2630–2637.

Loh K, Deng H, Fukushima A, Cai X, Boivin B, Galic S, Bruce C, Shields BJ, Skiba B, Ooms LM, Stepto N, Wu B, Mitchell CA, Tonks NK, Watt MJ, Febbraio MA, Crack PJ, Andrikopoulos S, Tiganis T. Reactive Oxygen Species Enhance Insulin Sensitivity. *Cell Metabol.* 2009; 10(4): 260–272.

Lundbaek K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J.* 1962; 1(5291): 1507–1513.

Luukkonen PK, Sädevirta S, Zhou Y, Kayser B, Ali A, Ahonen L, Lallukka S, Pelloux V, Gaggini M, Jian C, Hakkarainen A, Lundbom N, Gylling H, Salonen A, Oresic M, Hyötyläinen T, Orho-Melander M, Rissanen A, Gastaldelli A, Clément K, Hodson L, Yki-Järvinen H. Saturated fat is more metabolically harmful for the human liver than unsaturated fat or simple sugars. *Diabetes Care.* 2018; 41(8): 1732–1739.

Ly LD, Xu S, Choi S-K, Ha C-M, Thoudam T, Cha S-K, Wiederkehr A, Wollheim CB, Lee I-K, Park K-S. Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp Mol Med.* 2017; 49(2 - e291): 1-12.

Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014; 7: 55–64.

Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després JP, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care.* 2010; 33(11): 2477–2483.

Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 2017; 169(3): 381–405.

Mardare C, Krüger K, Liebisch G, Seimetz M, Couturier A, Ringseis R, Wilhelm J, Weissmann N, Eder K, Mooren FC. Endurance and resistance training affect high fat diet-induced increase of ceramides, inflammasome expression, and systemic inflammation in mice. *J Diabetes Res.* 2016; 2016: 1–13.

Marko DM, Shamshoum H. Rac1 supports muscle glucose uptake independently of Akt. *J Physiol.* 2018; 596(20): 4815–4816.

Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract.* 2013; 7(5): e330–e341.

Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 314: 1-16.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem.* 1969; 244(22): 6049–6055.

Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci.* 2018; 63(1): 68–78.

Mistério da Saúde. Ministério da Saúde (Brasil). Departamento de Atenção Básica. Promoção da Saúde e da Alimentação Adequada e Saudável. Excesso de Peso e Obesidade. Disponível em:

<http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_promocao_da_saude.php?conteudo=excesso>. Acesso em: 17 jan. 2019.

Morenga L Te, Mallard S, Mann J. Dietary sugars and body weight: Systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *BMJ (Online)*. 2013; 346(e7492): 1–25.

Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Changes in Diet and Lifestyle and Long-Term Weight Gain in Women and Men. *N Engl J Med*. 2011; 364(25): 2392–2404.

Mukherjee B, Mobaswar Hossain C, Mondal L, Paul P, Kumar Ghosh M. Obesity and Insulin Resistance: An Abridged Molecular Correlation. *Lipid Insights*, 2013; 6: 1-11.

Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª ed ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2014.

NHS. National Health Service (UK). Obesity. Disponível em: <<https://www.nhs.uk/conditions/obesity/causes/>>. Acesso em: 15 jan 2019.

Nimptsch K, Konigorski S, Pischon T. Diagnosis of obesity and use of obesity biomarkers in science and clinical medicine. *Metabolism*. 2019; 92: 61–70 Epub 2018 Dec 2018.

Nishimura M, Nikawa T, Kawano Y, Nakayama M, Ikeda M. Effects of dimethyl sulfoxide and dexamethasone on mRNA expression of housekeeping genes in cultures of C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 367(3): 603-608.

Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B, Betteridge DJ. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia*. 1997; 40(6): 647–653.

O'Neill HM. AMPK and exercise: Glucose uptake and insulin sensitivity. *Diabetes Metab J*. 2013; 37(1): 1–21.

Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, Schön MR, Blüher M, Punkt K. Altered Fiber Distribution and Fiber-Specific Glycolytic and Oxidative Enzyme Activity in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29(4): 895–900.

Obesity: Its Causes and Treatment. Part II - Treatment. *The Hospital (London)*. 1891; 11: p.58.

Obesity: Its Causes and Treatment. *The Hospital (London)*. 1891; 11(265): p.46.

Ohkawara K, Tanaka S, Miyachi M, Ishikawa-Takata K, Tabata I. A dose-response relation between aerobic exercise and visceral fat reduction: Systematic review of clinical trials. *Int J Obes (Lond)*. 2007; 31(12): 1786–1797.

Okura T, Nakata Y, Lee DJ, Ohkawara K, Tanaka K. Effects of aerobic exercise and obesity phenotype on abdominal fat reduction in response to weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2005; 29(10): 1259–1266.

Oliver T. Post-mortem in a case of extreme obesity. *J Anat Physiol*. 1880; 14(3): 345–347.

Orlando G, Balducci S, Bazzucchi I, Pugliese G, Sacchetti M. Neuromuscular dysfunction in type 2 diabetes: Underlying mechanisms and effect of resistance training. *Diabetes Metab Res Rev*. 2016; 32(1): 40–50.

Paolisso G, D'Amore A, Volpe C, Balbi V, Saccomanno F, Galzerano D, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F. Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism*. 1994; 43(11): 1426–1429.

Pappachan JM, Viswanath AK. Medical Management of Diabetes: Do We Have Realistic Targets? *Curr Diab Rep.* 2017; 17(1): 1–10.

Patsouris D, Cao JJ, Vial G, Bravard A, Lefai E, Durand A, Durand C, Chauvin M-AA, Laugerette F, Debard C, Michalski MC, Laville M, Vidal H, Rieusset J. Insulin resistance is associated with MCP1-mediated macrophage accumulation in skeletal muscle in mice and humans. *PLoS ONE.* 2014; 9(10-e110653): 1–14.

Patti ME, Kahn CR. The Insulin Receptor- A Critical Link In Glucose Homeostasis And Insulin Action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1999; 10(1): 1–14.

Pernot F, Dorandeu F, Beaup C, Peinnequin A. Selection of reference genes for real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in hippocampal structure in a murine model of temporal lobe epilepsy with focal seizures. *J Neurosci Res.* 2010; 88(5): 1000–1008.

Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 2018; 98: 2033–2223.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): 16–21.

Pieri BLS. Envolvimento das espécies reativas de oxigênio na resistência muscular à insulina em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - PPGCS. Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina - UNESC, 2017.

Pimenta AS, Gaidhu MP, Habib S, So M, Fediuc S, Mirpourian M, Musheev M, Curi R, Ceddia RB. Prolonged exposure to palmitate impairs fatty acid oxidation despite activation of AMP-activated protein kinase in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* 2008; 217(2): 478–485.

Pinho RA, Sepa-Kishi DM, Bikopoulos G, Wu M V., Uthayakumar A, Mohasses A, Hughes MC, Perry CGR, Ceddia RB. High-fat diet induces skeletal muscle oxidative

stress in a fiber type-dependent manner in rats. *Free Radic Biol Med*. 2017; 110(July): 381–389.

Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51(5): 942–950.

Rada I, Deldicque L, Francaux M, Zbinden-Foncea H. Toll like receptor expression induced by exercise in obesity and metabolic syndrome: A systematic review. *Exerc Immunol Rev*. 2018; 24(14): 60–71.

Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2006; 1(6): 3159–65.

Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50(5): 567–575.

Renahan A, Tyson M, Egger M, Heller R, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008; 371(9612): 569–78.

Rhee SG. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006; 312(5782): 1882–1883.

Rhee SG, Yang K-S, Kang SW, Woo HA, Chang T-S. Controlled Elimination of Intracellular H₂O₂: Regulation of Peroxiredoxin, Catalase, and Glutathione Peroxidase via Post-translational Modification. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(5–6): 619–631.

Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol*. 2014; 26(3): 237–245.

Sadeghi A, Seyyed Ebrahimi SS, Golestani A, Meshkani R. Resveratrol Ameliorates Palmitate-Induced Inflammation in Skeletal Muscle Cells by Attenuating Oxidative Stress and JNK/NF- κ B Pathway in a SIRT1-Independent Mechanism. *J Cell Biochem*.

2017; 118(9): 2654–2663.

Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The Expression of TNF alpha by Human Muscle: Relationship to Insulin Resistance. *J Clin Invest.* 1996; 97(4): 1111–1116.

Sakellariou GK, Jackson MJ, Vasilaki A. Redefining the major contributors to superoxide production in contracting skeletal muscle. The role of NAD(P)H oxidases. *Free Radic Res.* 2014; 48(1): 12–29.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 414(6865): 799–806.

Scheffer DL, Silva LA, Tromm CB, Da Rosa GL, Silveira PCL, De Souza CT, Latini A, Pinho RA. Impact of different resistance training protocols on muscular oxidative stress parameters. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012; 37(6): 1239–1246.

Schmidt RH, Nickerson JM, Boatright JH. Exercise as Gene Therapy: BDNF and DNA Damage Repair. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* 2016; 5(4): 309–311.

Serván PR. Obesity and Diabetes. *Nutr Hosp.* 2013; 28: 138–143.

Setayesh T, Nersesyan A, Mišík M, Ferk F, Langie S, Andrade VM, Haslberger A, Knasmüller S. Impact of obesity and overweight on DNA stability: Few facts and many hypotheses. *Mutat Res.* 2018; 777: 64–91.

Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotoni K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med.* 1996; 2(7): 800–803.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006; 116(7): 1793–1801.

Sinha I, Sakthivel D, Varon DE. Systemic regulators of skeletal muscle regeneration in obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017; 8(29): 1–7.

So M, Gaidhu MP, Maghdoori B, Ceddia RB. Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids Health Dis*. 2011; 10(1): 99.

Solinas G, Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Mol Metab*. 2017; 6(2): 174–184.

Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *The FASEB Journal*. 2010; 24(8): 2596–2611.

Souza M, Leite R, Lino A, Marqueti R, Bernardes C, Araujo H, Bouskella E, Shiguemoto G, Perez S, Kraemer-Aguiar L. Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. *Clinics*. 2014; 69(4): 265–270.

Strasser B, Arvandi M, Siebert U. Resistance training, visceral obesity and inflammatory response: a review of the evidence. *Obes Rev*, 2012; 13(7): 578–591.

Suh S-H, Paik I-Y, Jacobs K. Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise. *Mol Cells*. 2007; 23(3): 272–279.

Sylow L, Kleinert M, Pehmøller C, Prats C, Chiu TT, Klip A, Richter EA, Jensen TE. Akt and Rac1 signaling are jointly required for insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle and downregulated in insulin resistance. *Cell Signal*. 2014; 26(2): 323–331.

Sylow L, Nielsen IL, Kleinert M, Møller LLV, Ploug T, Schjerling P, Bilan PJ, Klip A, Jensen TE, Richter EA. Rac1 governs exercise-stimulated glucose uptake in skeletal muscle through regulation of GLUT4 translocation in mice. *J Physiol*. 2016; 594(17): 4997–5008.

Talebi-Garakani E, Safarzade A. Resistance training decreases serum inflammatory markers in diabetic rats. *Endocrine*. 2013; 43(3): 564–570.

Tang L, Gao X, Yang X, Liu C, Wang X, Han Y, Zhao X, Chi A, Sun L. Ladder-Climbing Training Prevents Bone Loss and Microarchitecture Deterioration in Diet-Induced Obese Rats. *Calcif Tissue Int*. 2016; 98(1): 85–93.

Tang L, Luo K, Liu CT, Wang XD, Zhang D Di, Chi AP, Zhang J, Sun LJ. Decrease in myostatin by ladder-climbing training is associated with insulin resistance in diet-induced obese rats. *Chin Med J (Engl)*, 2014; 127(12): 2342–2349.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(2): 85-96.

Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Okano T, Yoshioka A, Shima M. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 374(1): 106-110.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(10): 772–783.

Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(11): 833–846.

Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - Adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem*. 2011; 117(2): 47–56.

Treatment of obesity. *Ind Med Gaz*. 1889; 25: p.21.

Turner N, Hariharan K, TidAng J, Frangioudakis G, Beale SM, Wright LE, Zeng XY, Leslie SJ, Li JY, Kraegen EW, Cooney GJ, Ye JM. Enhancement of muscle mitochondrial oxidative capacity and alterations in insulin action are lipid species dependent: Potent tissue-specific effects of medium-chain fatty acids. *Diabetes*. 2009;

58(11): 2547–2554.

Verma S, Hussain ME. Obesity and diabetes: An update. *Diabetes Metab Syndr*. 2017; 11(1): 73–79.

Vichaiwong K, Henriksen EJ, Toskulkao C, Prasannarong M, Bupha-Intr T, Saengsirisuwan V. Attenuation of oxidant-induced muscle insulin resistance and p38 MAPK by exercise training. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(5): 593–599.

Vilela TC, Effting PS, Dos Santos PG, Farias H, Paganini L, Rebelo HS, Nesi RT, De Andrade VM, De Pinho RA. Aerobic and strength training induce changes in oxidative stress parameters and elicit modifications of various cellular components in skeletal muscle of aged rats. *Exp Gerontol*. 2018; 106(0531–5565): 21–27.

Villareal DT, Aguirre L, Gurney AB, Waters DL, Sinacore DR, Colombo E, Armamento-Villareal R, Qualls C. Aerobic or Resistance Exercise, or Both, in Dieting Obese Older Adults. *N Engl J Med*. 2017; 376(20): 1943–1955.

Walberg JL. Aerobic Exercise and Resistance Weight-Training During Weight Reduction. *Sports Med*. 1989; 7(6): 343–356.

Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*. 2012; 821: 421–433.

Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 2006; 174(6): 801–809.

Way KL, Hackett DA, Baker MK, Johnson NA. The Effect of Regular Exercise on Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diabetes Metab J*. 2016; 253–269.

Weir GC, Bonner-Weir S. Five of stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 2004; 53(Supple 3): S16-S21.

White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, Souza LA, Soares AF, Paula A, Barbosa O, De JM, Neto R, Marçal AC, Machado UF, Camargo EA, Santos MR V, Brito LC. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2013; 57(5): 339–384.

Whitham M, Chan MHS, Pal M, Matthews VB, Prelovsek O, Lunke S, El-Osta A, Broenneke H, Alber J, Brüning JC, Wunderlich FT, Lascaster GI, Febbraio MA. Contraction-induced Interleukin-6 Gene Transcription in Skeletal Muscle Is Regulated by c-Jun Terminal Kinase/Activator Protein-1. *J Biol Chem.* 2012; 287(14): 10771–10779.

WHO. Global Report on Diabetes. World Health Organization. World Health Organisation Global report on diabetes. 2016; v.1. 88p. Disponível em: <http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.html>. Acesso em: 18 jan. 2019.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <<https://www.who.int/topics/obesity/en/>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

Willett W, Rockström J, Loken B, Springmann M, Lang T, Vermeulen S, Garnett T, Tilman D, DeClerck F, Wood A, Jonell M, Clark M, Gordon L, Fanzo J, Hawkes C, Zurayk R, Rivera JA, Vries W De, Sibanda L, Afshin A, Chaudhary A, Herrero M, Agustina R, Branca F, Lartey A, Fan S, Crona B, Fox E, Bignet V, Troell M, Lindahl T, Singh S, Cornell S, Reddy S, Narain S, Nishtar S, Murray C. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet.* 2019; 393(10170): 447–492.

Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sági Z, Öry I, Salamon F, Kovács M, Vargha P, Szekeres O, Speer G, Karádi I, Sikter M, Kaszás E, Dworak O, Gerö G, Cseh K. Expression of tumor necrosis factor (TNF)- α protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF- α , soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. *Eur J Endocrinol.* 2003; 149(2):

129–135.

Wu Y, Wu T, Wu J, Zhao L, Li Q, Varghese Z, Moorhead JF, Powis SH, Chen Y, Ruan XZ. Chronic inflammation exacerbates glucose metabolism disorders in C57BL/6J mice fed with high-fat diet. *J Endocrinol*. 2013; 219(3): 195–204.

Xiang Y, Donley J, Seletskiaia E, Shingare S, Kamerud J, Gorovits B. A Simple Approach to Determine a Curve Fitting Model with a Correct Weighting Function for Calibration Curves in Quantitative Ligand Binding Assays. *The AAPS Journal*. 2018; 20(45): 1–9.

Xiao T, Fu Y-F. Resistance training vs. aerobic training and role of other factors on the exercise effects on visceral fat. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015; 19(10): 1779–1784.

Yang Z, Scott CA, Mao C, Tang J, Farmer AJ. Resistance exercise versus aerobic exercise for type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Sports Med*. 2014; 44(4): 487–499.

Yaspelkis BB, Singh MK, Trevino B, Krisan AD, Collins DE. Resistance training increases glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2002; 175(4): 315–323.

Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *American journal of physiology*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 299(6): E1096–E1105.

Zanuso S, Jimenez A, Pugliese G, Corigliano G, Balducci S. Exercise for the management of type 2 diabetes: a review of the evidence. *Acta Diabetol*. 2010; 47: 15–22.

Zanuso S, Sacchetti M, Sundberg CJ, Orlando G, Benvenuti P, Balducci S. Exercise in type 2 diabetes: genetic, metabolic and neuromuscular adaptations. A review of the

evidence. *Br J Sports Med.* 2017; 51: 1533–1538.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Bio Med.* 2002; 33(3): 337–349.

Zong G, Gao A, Hu FB, Sun Q. Whole grain intake and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer. *Circulation.* 2016; 133(24): 2370–2380.

APÊNDICE A
Figura Suplementar 1

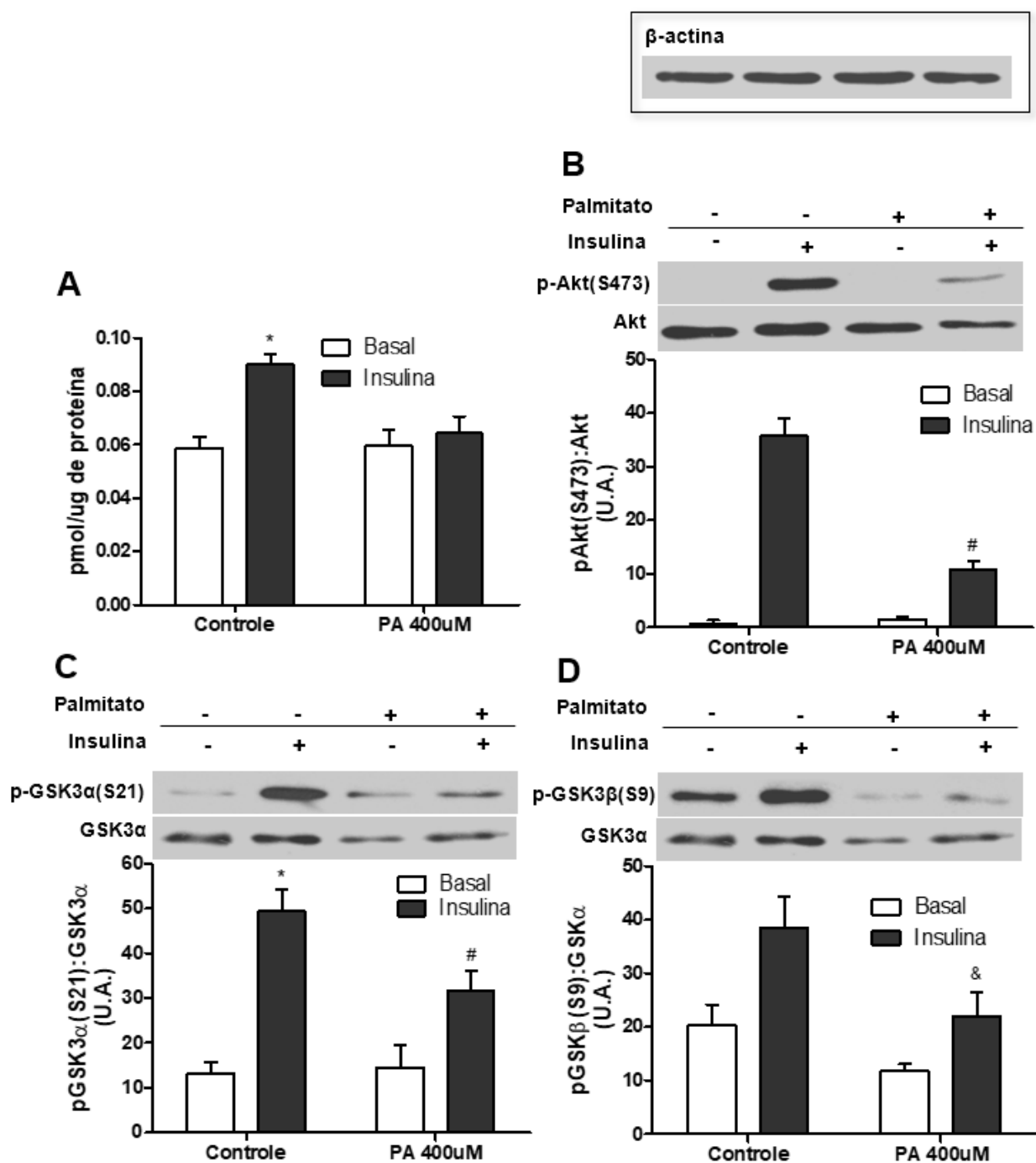


Figura Suplementar 1: Efeitos da exposição ao palmitato na captação de glicose estimulada por insulina e na sinalização molecular da insulina em células musculares L6. Efeito de 24 horas de exposição ao palmitato (400uM) sobre condições basais e com estímulo de insulina (100nM): na captação de glicose (protocolo ^3H 2-Deoxy Glicose) (A); e na fosforilação da Akt (B), GSK3 α (C) e GSK3 β (D). As células-controle receberam somente albumina livre de ácido graxo. Dados expressos em média \pm erro padrão da média. Na figura A: * $p < 0,05$ versus todas as outras condições. Nas figuras B-D: * $p < 0,05$ vs Con Basal; # $p < 0,05$ vs PA Basal e Con Insulina; & $p < 0,05$ vs Con Insulina. Materiais e métodos descritos abaixo.

MATERIAIS E MÉTODOS – Figura Suplementar 1

S.1.1 Cultura de Células L6

Mioblastos de ratos (L6) foram gentilmente doados pelo professor Dr. Rolando Ceddia da York University (Toronto, Canadá). As células musculares L6 foram cultivadas em α MEM contendo 10% (v/v) SFB, 100U/ml de penicilina, 100mg/ml de streptomycina e antimicótico (meio de crescimento), em uma atmosfera umidificada a 95% de O₂ e 5% de CO₂, a 37°C (Pimenta et al., 2008). Para procedimentos experimentais, as células foram semeadas em placas de 24 poços para captação de glicose, ou seis poços para lisado celular, em meio de diferenciação (α MEM contendo 2% (v/v) SFB).

S.1.2 Resistência à Insulina

Baseado em estudo prévio (Pimenta et al., 2008) as células foram expostas a 400uM por 24h. As células/poços controles receberam somente BSA livre de ácido graxo, 12.5% (p/v). Nos poços selecionados receberam insulina (100nM) 30 minutos antes do término do período total de exposição ao palmitato.

S.1.3 Complexo Palmitato e Albumina

O palmitato (160mg) foi dissolvido em 0.1 ml de NaOH 10N com vórtex contínuo (1 – 2 min) e então foi lentamente adicionado a 30 ml de α MEM pré-aquecido (50°C) contendo 12.5% (p/v) de albumina livre de ácido graxo (*fatty free-acid* BSA). A solução foi protegida da luz e mantida em banho maria de 3h a 4 h por 50°C. Após, o pH foi ajustado para 7.4 e a solução foi filtrada para eliminar todo o palmitato não dissolvido. Um volume de 6ml da mesma solução contendo BSA livre de ácidos graxos 12.5% (p/v) e NaOH 10N foi preparado da mesma forma para ser utilizado no tratamento dos grupos controles (os que não receberam palmitato). A concentração do palmitato nas soluções foi determinada utilizando o NEFA kit (Waki Chemicals, Inc.). Alíquotas estéreis das soluções foram armazenadas no -20°C para todos os experimentos realizados.

S.1.4 Captação de Glicose

Após cada tratamento/exposição específicos as células foram lavadas duas vezes com solução-tampão HEPES (HBS) em temperatura ambiente e então aspirada todo tampão remanescente. Para captação específica, foi adicionado 200ul de Solução de Transporte (10uM 2-Deoxy Glucose, 0.5uCi/ml ^3H 2-Deoxy Glucose (35-45 com/pmol, NEN:NET-549)) por poço (placa de 24 poços). Já para captação não específica, foi utilizado Solução de Transporte contendo 10uM de *Cytochalasin B* nos poços selecionados. Incubado 5 minutos em temperatura ambiente com ambas soluções de transporte e então aspirado rapidamente todo volume líquido e lavado cada poço com solução salina 0.9% resfriada e, após, aspirado novamente todo o tampão remanescente. Ao final, adicionado 250ul de 0.05N NaOH em cada poço. As células foram lisadas no agitador orbital, em alta velocidade, por aproximadamente 20 minutos, sendo 200ul utilizados para leitura em cintilador, e 20ul estocados para posterior determinação da quantidade de proteína pelo método de Bradford.

S.1.5 Western Blot

Após cada tratamento/exposição específico as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) resfriado e em seguidas lisadas com o *cell scraper* em tampão de lise com inibidores de proteases (cOmplete ULTA tablets) e de fosfatases (PhosStop) e uma alíquota de cada amostra foi utilizada para determinar a concentração de proteínas pelo método de Bradford. As amostras foram diluídas 1:1 em *Laemmli sample buffer* (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8; 2% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate; 50mM DTT; 0.01% (wt/vol) bromophenol blue) e aquecidas a 95°C por 5 minutos antes de serem pipetadas em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida gel (SDS-PAGE), e então transferidas para membranas de difluoreto de polivinilo (PVDF) (Bio-Rad Laboratories). Alíquotas do lisado de célula contendo 10ug de proteínas foram utilizadas para determinar o conteúdo de Akt total, p-Akt, GSK α total, p-GSK α/β , AMPK α total, p-AMPK α GAPDH, β -actina. Os blots foram escaneados e a densidade foi mensurada pelo programa ScionImage. Os valores (expressos em unidades arbitrárias) foram obtidos dividindo a densidade da banda de interesse pela densidade da banda da respectiva β -actina do mesmo blot. Similarmente, os valores das

proteínas fosforiladas foram normalizados pelo valor de suas proteínas totais (ex. p-Akt normalizada pela Akt total).

S.1.6 Análise estatística

Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) two-way, seguido pelo teste post hoc Bonferroni. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $p < 0,05$. Foi utilizado o GraphPad Prism versão 5 como pacote estatístico.

ANEXO A**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Em Animais (CEUA – UNESC)**



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 067/2014-2

Professor responsável: Ricardo Aurino de Pinho

Equipe: Pauline Souza Effting

Título: “O papel da AMPK na inibição do sistema NADP(H) oxidase e na regulação da homeostase do cálcio em músculo esquelético e cardíaco de animais expostos a dieta hiperlipídica: um possível efeito regulatório do exercício sobre a resistência à insulina”

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 132 Ratos Wistar de 60 dias, pesando aproximadamente 250 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 067/2014-2

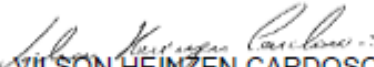
Principal Investigator: Ricardo Aurino de Pinho

Researchers: Pauline Souza Effting

Project title: “*The role of AMPK in the inhibition of NADP(H) oxidase system and in the regulation of calcium homeostasis in skeletal muscle and heart of animals exposed to high-fat diet: a possible regulatory effect of exercise on insulin resistance*”

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 02 de dezembro de 2014.


VILSON HEINZEN CARDOSO
 Coordenador Adjunto da CEUA