



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes


Victor Faria Motta

**Benefícios do treinamento intervalado de alta intensidade (natação)
na obesidade (estudo experimental)**

Rio de Janeiro
2014

Victor Faria Motta

**Benefícios do treinamento intervalado de alta intensidade (natação) na
obesidade (estudo experimental)**



Dissertação apresentada, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M921 Motta, Victor Faria.
Benefícios do treinamento intervalado de alta intensidade (natação) na
obesidade (estudo experimental) / Victor Faria Motta. – 2014.
54 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia
Humana e Experimental.

1. Exercícios físicos aquáticos - Teses. 2. Obesidade – Prevenção - Teses.
3. Obesidade - Teses. 5. Lipídios - Metabolismo - Teses. 5. Diabetes - Teses. 6.
Fígado - Doenças - Teses. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto
Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.72:616-056.52

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou
parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Victor Faria Motta

**Benefícios do treinamento intervalado de alta intensidade (natação) na
obesidade (estudo experimental)**

Dissertação apresentada, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2014.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Gustavo Casimiro Lopes
Instituto de Educação Física e Desporto - UERJ

Prof. Dr. Pedro Paulo da Silva Soares
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Para a minha família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Heloisa e Carlos Alberto, que me deram todos os subsídios, sejam eles de qualquer natureza for, para me manter motivado, alegre e saudável (mental e fisicamente),

A minha irmã Gabriela, que me ouviu quando precisei, que me apoiou nos momentos de desânimo, que esteve ao meu lado incondicionalmente,

A minha namorada Gabriela, por todos os momentos de paciência e compreensão, para que este trabalho pudesse ser escrito com calma e presteza.

A Dra. Cyrla Zaltman, médica responsável pela orientação no meu tratamento. Mais um ano juntos, e espero que tenhamos muitos outros,

Aos amigos Alini Schultz e Marcel Pimenta, por todo suporte “braçal” e intelectual neste trabalho. Sem vocês, isso tudo não aconteceria,

Aos meus novos amigos Helder Gonçalves, Fernanda Cavalcante, Verônica Aiceles, Flávia Gombar e Jorge Alves. Por nossa nova amizade. Que ela perdure por muitíssimo tempo. Muito obrigado pela ajuda de vocês,

Às minhas amigas Thatiany Marinho e Michelle Soares pelo apoio técnico no meu trabalho. Sem vocês, nada disso poderia ter sido realizado,

A Prof^a Dr^a Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda, pela atenção e p r e s t e z a com o meu trabalho, e por toda a assessoria nos aspectos nutricionais de meu trabalho,

E, por fim, ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda. Pela confiança durante o período deste trabalho. Agradeço a possibilidade de pertencer a um laboratório de renome, onde pude desenvolver meu trabalho com todo o suporte técnico.

Até cortar os próprios defeitos pode ser perigoso.
Nunca se sabe qual é o defeito que sustenta nosso edifício inteiro.

Clarice Lispector

RESUMO

MOTTA, Victor Faria. *Benefícios do treinamento intervalado de alta intensidade (natação) na obesidade (estudo experimental)*. 2014. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

É um desafio na sociedade moderna controlar a obesidade e comorbidades associadas na população. O objetivo do estudo foi avaliar o impacto do treinamento intervalado de alta intensidade no contexto da obesidade induzida por dieta em modelo animal. Camundongos C57BL/6 foram alimentados com ração padrão (grupo magro - LE) ou dieta rica em gordura (grupo obeso - OB). Após 12 semanas, os animais foram divididos em grupos não treinados (LE-NT e OB-NT) e grupos treinados (LE-T e OB-T) e teve início um protocolo de exercício. Nos grupos treinados em comparação aos grupos não treinados observou-se que o treinamento intervalado de alta intensidade levou a reduções significativas na massa corporal, glicemia e tolerância oral à glicose, colesterol total, triglicérides, lipoproteína de baixa densidade-colesterol, aspartato transaminase e alanina aminotransferase no fígado. Além disso, nos grupos treinados, o protocolo de exercício melhorou a imunodensidade de insulina nas ilhotas, reduziu os níveis de citocinas inflamatórias, adiposidade e esteatose hepática. O treinamento de alta intensidade melhorou a beta-oxidação e os níveis de receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPAR)-alfa e reduziu os níveis de lipogênese e de PPAR-gama no fígado. No músculo esquelético, o treinamento de alta intensidade também melhorou o PPAR-alfa e transportador de glicose (GLUT) -4 e reduziu os níveis de PPAR-gama. Esses achados reforçam a noção de que o treinamento de alta intensidade é relevante como uma abordagem não farmacológica para controlar a resistência à insulina, glicemia, e esteatose hepática. Em conclusão, treinamento de alta intensidade leva à perda de massa corporal e pode atenuar os efeitos adversos causados pela ingestão crônica de uma dieta rica em gordura. Apesar de uma ingestão contínua dessa dieta, o treinamento de alta intensidade melhora as enzimas hepáticas e o perfil inflamatório.

Palavras-chaves: Obesidade. Metabolismo lipídico. Treinamento físico. Diabetes. Doença hepática gordurosa não alcoólica.

ABSTRACT

MOTTA, Victor Faria. *Beneficial effects of high intensity interval training (swimming) in obesity (experimental study)*. 2014. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Controlling obesity and other comorbidities in the population is a challenge in modern society. The aim of this study is to assess the impact of high-intensity interval training (HIIT) in the context of diet-induced obesity in animal model. C57BL/6 mice were fed one of two diets: standard chow (Lean group - LE) or a high-fat diet (Obese group – OB). After twelve weeks, the animals were divided into non-trained groups (LE-NT and OB-NT) and trained groups (LE-T and OB-T), and began an exercise protocol. High-intensity interval training leads to significant decreases in body mass, glycaemia and oral glucose tolerance, total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein cholesterol, aspartate transaminase and alanine aminotransferase in the liver in the trained groups compared to the non-trained groups. Additionally in the trained groups, the exercise protocol improves the insulin immunodensity in the islets, reduces inflammatory cytokine levels, the adiposity and the hepatic steatosis. HIIT improves beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha and reduces lipogenesis and PPAR-gamma levels in the liver. In skeletal muscle, HIIT also improves PPAR-alpha and glucose transporter-4 and reduces PPAR-gamma levels. The present findings reinforce the notion that HIIT is relevant as a non-pharmacological approach to control insulin resistance, glycaemia, and hepatic steatosis. In conclusion, HIIT leads to weight loss and can attenuate the adverse effects caused by chronic ingestion of a high-fat diet, despite a continuous intake of this diet, by improving the liver enzymes and the inflammatory profile.

Keywords: Obesity. Lipid metabolism. Exercise training. Diabetes. Nonalcoholic fatty liver disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental.....	24
Figura 2 – Evolução da massa corporal.....	31
Tabela 1 – Bioquímica e perfil inflamatório plasmáticos.....	32
Figura 3 – Teste oral de tolerância à glicose.....	33
Figura 4 – Ilhotas pancreáticas.....	34
Figura 5 – Análise do tecido adiposo.....	35
Figura 6 – Análise da esteatose hepática.....	36
Figura 7 – Western blot (fígado).....	37
Figura 8 – Western blot (músculo esquelético).....	38
Figura 9 – Expressões relativas de RNAm no músculo esquelético.....	39
Figura 10 – Expressões relativas de RNAm no fígado.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGL	Ácidos graxos livres
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
AST	Aspartato aminotransferase
CT	Colesterol total
DCV	Doença cardiovascular
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
GGT	Gama glutamil transferase
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
HDL-C	Colesterol de alta densidade lipídica
HIIT	Treinamento de alta intensidade
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corpórea
LDL-C	Colesterol de baixa densidade lipídica
LE	Magro
LE-NT	Magro não treinado
LE-T	Magro treinado
MC	Massa corporal
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
NAFLD	Doença não alcoólica do fígado gorduroso
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
OB	Obeso
OB-NT	Obeso não treinado
OB-T	Obeso treinado
PPAR-ALFA	Peroxisoma receptor ativado por proliferador alfa

PPAR-GAMA	Peroxisoma receptor ativado por proliferador gama
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	PCR tempo real quantitativo
SCD	<i>Stearoyl CoA desaturase</i>
SMet	Síndrome metabólica
SREBP-1C	<i>Sterol regulatory element-binding proteins</i>
TG	Triglicerídeos
TMN	Tempo máximo de nado
TNF	Fator de necrose tumoral
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
VLDL	Colesterol de muito baixa densidade

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	Síndrome metabólica	15
1.2	Obesidade	17
1.3	Esteatose hepática	18
1.4	Resistência à insulina	19
1.5	Exercício físico	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Gerais	22
2.2	Específicos	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Animais e dietas	23
3.2	Protocolo de treinamento	24
3.3	Massa corporal e ingestão alimentar	25
3.4	Teste oral de tolerância à glicose	25
3.5	Análises bioquímicas plasmáticas	26
3.6	Morfometria de adipócitos e ilhotas pancreáticas	26
3.7	Estereologia do fígado	26
3.8	Western Blot	27
3.9	RT-PCR quantitativo	28
3.10	Eutanásia	29
3.11	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Massa corporal	30
4.2	Bioquímica e citocinas inflamatórias plasmáticas	30
4.3	Teste oral de tolerância à glicose	33
4.4	Ilhotas pancreáticas	34
4.5	Índice de adiposidade e diâmetro de adipócitos	35
4.6	Esteatose hepática	36
4.7	Western blot (fígado): FAS, SREBP1-C e PPARs	37

4.8	Western blot (músculo esquelético): GLUT4 e PPARs.....	38
4.9	RT-PCR do fígado e músculo esquelético.....	39
5	DISCUSSÃO.....	41
	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais.....	53
	ANEXO B – Termo de submissão do artigo científico à publicação.....	54

INTRODUÇÃO

A "síndrome metabólica" (*SMet*), também chamada de síndrome X ou tríade maldita, atinge cerca de 1/4 da população mundial e se caracteriza pela associação de diversos componentes, como: hipertensão arterial sistêmica, obesidade, resistência à insulina (*RI*) ou diabetes mellitus tipo 2 (*DM2*) e dislipidemia.

A prevalência da *SMet* está associada à população estudada e seus fatores de risco, tais como genética, idade, meio ambiente e outros. Além disso, o potencial de aparecimento de hipertensão, *RI* e *DM2* aumentam com o envelhecimento da população. Sendo assim, podemos prever um aumento significativo da prevalência da *SMet* nas sociedades ocidentais (Alberti *et al.*, 2005).

Diversos mecanismos envolvidos nos diferentes componentes da *SMet* são alvos de estudo para a melhor compreensão e tratamento da população. A proposta de utilizar o exercício físico como tratamento auxiliar da *SMet* tem sido enfatizado recentemente (Strasser, 2013).

Camundongos da linhagem C57BL/6 desenvolvem obesidade e *RI* quando alimentados com dieta rica em gordura, mimetizando a *SMet* em humanos (Gallou-Kabani *et al.*, 2007; Fraulob *et al.*, 2010). Estudos prévios em nosso laboratório têm demonstrado que o exercício atua melhorando praticamente todos os componentes da *SMet* (Marques *et al.*, 2010; Motta e Mandarim-de-Lacerda, 2012; Schultz *et al.*, 2012; Schultz *et al.*, 2013), inclusive quando a menopausa se adiciona à *SMet* (Marques *et al.*, 2006).

O treinamento intervalado de alta intensidade, ou *HIT* na sigla em inglês para "High-Intensity Interval training", é caracterizado por estímulos em intensidade forte a muito forte com recuperação curta, gerando um déficit na demanda de oxigênio para o nosso sistema aeróbio (Gibala e Jones, 2013). Esse déficit de oxigênio durante o *HIT* resulta em um metabolismo acelerado que dura horas após o término da atividade (Qiao *et al.*, 2006).

O presente estudo foi realizado para avaliar os efeitos benéficos promovidos pelo treinamento de natação (modalidade *HIT*) na obesidade e comorbidades, tais como *RI*, perfis inflamatórios, esteatose hepática não alcoólica, betaoxidação e lipogênese no fígado em um modelo animal de obesidade induzida por dieta.

1 REVISAO DA LITERATURA

1.1 Síndrome Metabólica

SMet é um transtorno de utilização e armazenamento de energia, diagnosticada por uma ocorrência de três em cada cinco das seguintes condições médicas: obesidade abdominal (central), elevação da pressão arterial, glicemia de jejum elevada, níveis de triglicerídeos séricos altos e baixos valores de HDL-colesterol. A *SMet* aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, insuficiência cardíaca e *DM2* (*DM2*) (Ma e Zhu, 2013).

A *SMet* é também conhecida como síndrome metabólica X, síndrome cardiometabólica, síndrome X, síndrome de *RI* e síndrome de Reaven (em homenagem a Gerald Reaven) (Reaven e Chen, 1988).

As definições mais recentes da *SMet* feitas pela International Diabetes Federation (IDF, 2013) e do National Cholesterol Education Program¹ (NCEP, 2001) são muito semelhantes e identificam os indivíduos com um determinado conjunto de sintomas como portadores de *SMet*. No entanto, há duas diferenças: a definição da IDF afirma que, se o índice de massa corporal (IMC) é maior que 30 kg/m², a obesidade central pode ser assumida e a circunferência da cintura não precisa ser medida.

Por outro lado, a definição do NCEP indica que a *SMet* pode ser diagnosticada com base em outros critérios. Além disso, a IDF utiliza pontos de corte específicos de geografia para a circunferência da cintura, enquanto NCEP usa apenas um conjunto de pontos de corte para circunferência da cintura, independentemente da geografia.²

Os mecanismos exatos das vias complexas da *SMet* estão sob investigação. A fisiopatologia é muito complexa e tem sido apenas parcialmente elucidada. Os fatores mais importantes são a genética, o envelhecimento, o comportamento

¹ Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285(19): 2486-2497, 2001.

² International Diabetes F. Diabetes and the millennium development goals. *Diabetes Res Clin Pract* 100:409-410, 2013.

sedentário ou de baixa prática de exercício físico (Sato *et al.*, 2007; Heinonen *et al.*, 2009). O estresse metabólico também pode ser um fator contribuinte. Existe um debate sobre se a obesidade ou a resistência insulínica é a causa da *SMet* ou se eles são consequências de um distúrbio metabólico de maior alcance. Uma série de marcadores de inflamação sistêmica, incluindo a proteína C-reativa, encontra-se muitas vezes aumentadas, assim como o fibrinogênio, interleucina (*IL*)-6, fator de necrose tumoral (*TNF*)-*alfa*, entre outros (Bagry *et al.*, 2008).

O panorama atual de consumo alimentar contribui para o desenvolvimento da *SMet* pois a dieta ocidental é incompatível com a nossa capacidade bioquímica (Johnson *et al.*, 2007). Assim, mais do que a adiposidade total, o componente central da *SMet* é a gordura visceral e/ou ectópica (isto é, gordura de órgãos não concebidos para o armazenamento de gordura), sendo a principal alteração metabólica a *RI* (Messier *et al.*, 2007). O fornecimento contínuo e excessivo de energia na dieta através de carboidratos, lipídios e proteínas leva a um acúmulo de produtos de oxidação mitocondrial que está associado à disfunção mitocondrial progressiva e *RI* (Koves *et al.*, 2008).

A relevância clínica da *SMet* ganha destaque em virtude de seu impacto no aumento do risco para o *DM2* e para as doenças cardiovasculares (Iellamo *et al.*, 2013). A presença dessa síndrome na infância e adolescência prediz sua manutenção na vida adulta e o desenvolvimento da *DM2*. Além disso, aumenta o risco de eventos cardiovasculares prematuros, o que ressalta a importância de estratégias de detecção e prevenção das anormalidades que a constituem. A princípio, a obesidade precoce, ainda que não acompanhada de outros componentes da *SMet*, já se mostra como um fator que anuncia a *SMet* na vida adulta (Morrison *et al.*, 2007).

A obesidade é considerada a principal causa da *RI*, que, por sua vez, associa-se ao desenvolvimento do *DM2* (Alberti *et al.*, 2005). No que se refere às doenças cardiovasculares, embora crianças e adolescentes não apresentem em geral doença cardiovascular franca, as crianças obesas apresentam perfil de risco cardiovascular compatível com seu desenvolvimento precoce. Na adolescência, a *RI*, particularmente quando simultânea à obesidade, revela significativo papel no desenvolvimento de fatores de risco cardiovascular incluídos na *SMet* (Sinaiko *et al.*, 2005). A hiperinsulinemia de jejum, como indicador da *RI*, associa-se às

alterações lipídicas que podem conduzir à aterosclerose (Steinberger *et al.*, 2009). Adolescentes com excesso de peso e *SMet* aos 13 anos apresentaram maior probabilidade de manifestar doença cardiovascular 25 anos mais tarde em relação ao grupo de adolescentes inicialmente diagnosticados com excesso de peso e sem a *SMet*. A incidência de doenças cardiovasculares foi 13 vezes maior nos indivíduos obesos com *SMet* quando jovens do que naqueles não identificados com a síndrome (Morrison *et al.*, 2007).

1.2 Obesidade

A obesidade já foi vista como sinônimo de beleza, bem-estar físico, riqueza e poder. Hoje, considerada a principal causa de morte evitável, a obesidade constitui um importante problema de saúde pública, tanto pelo seu impacto na expectativa média de vida, como pelos danos causados à própria qualidade de vida (Popkin e Doak, 1998). Para a Organização Mundial da Saúde já é uma epidemia global.

O *Índice de Massa Corporal* (IMC) é um indicador do grau de obesidade. Através do cálculo do IMC [peso (em kg) /altura (em metros)²] é possível saber se um indivíduo está acima ou abaixo dos parâmetros ideais de massa corporal para sua estatura. No entanto, a maior crítica ao IMC é não levar em consideração a constituição corporal (massa de gordura, massa magra e massa óssea) e sim a *massa corporal* total. A Organização Mundial da Saúde classifica o indivíduo como (Alberti *et al.*, 2005):

- a) eutrófico, IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²,
- b) com excesso de peso, IMC entre 25 e 29,9 kg/m²,
- c) obeso moderado, IMC entre 30 e 39,9 kg/m²,
- d) obeso mórbido, IMC \geq 40 kg/m².

O aumento do número de pessoas com sobrepeso e obesidade pode ser determinado pela crescente ingestão calórica associada à diminuição do gasto energético diário (Whyte *et al.*, 2013). Entretanto, a obesidade não está relacionada exclusivamente ao excesso de ingestão alimentar e à inatividade física, mas pode se

relacionar a fatores múltiplos e complexos. Assim, a obesidade, que apresenta uma etiologia multifatorial, pode então ser classificada em dois grandes contextos (Martinez, 2000):

- exógena, influenciada por fatores de origens comportamental, dietética e/ou ambiental, os quais representam em torno de 95% ou mais dos casos;
- endógena, relacionada com os componentes genéticos, neuropsicológicos, endócrinos e metabólicos, que representam até 5% dos casos.

1.3 Esteatose hepática

O fígado é um órgão vital e é a principal unidade de fabricação e armazenagem do nosso organismo e um dos responsáveis pela transformação das proteínas, dos açúcares e das gorduras que ingerimos (Gentile e Pagliassotti, 2008).

A *esteatose hepática* (ou doença do fígado gordo, ou doença hepática gordurosa não alcoólica) é uma condição reversível na qual grandes vacúolos de gordura acumulam-se nas células do fígado, que é conhecido como *esteatose hepática*. Várias causas podem estar relacionadas com a origem dessa doença. As mais frequentes são a ingestão excessiva de bebidas alcoólicas, a obesidade e o DM2 sem qualquer tipo de controle. Essa condição também é associada a outras doenças que influenciam o metabolismo da gordura (Fabbrini *et al.*, 2010; Gentile *et al.*, 2011).

O aumento das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), *gama* glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) está correlacionado ao diagnóstico precoce do acúmulo de gordura no fígado, independentemente da obesidade. A avaliação sérica da ALT parece ser mais sensível na identificação da esteatose hepática, quando comparada à AST e à GGT (Kotronen *et al.*, 2007; Kotronen e Yki-Jarvinen, 2008).

Os ácidos graxos livres (AGLs) no fígado são provenientes da gordura na dieta, liberado pelos adipócitos através da lipólise e da lipogênese *de novo* hepática. Um desequilíbrio de qualquer uma das vias envolvidas no envio de triglicerídeos, a síntese ("*input*") ou a exportação ["*output*"] - oxidação e secreção de lipoproteína de

muito baixa densidade (VLDL)], pode contribuir para o acúmulo dos AGLs no fígado (Utzschneider e Kahn, 2006). Quando há *RI*, ocorre inibição da lipólise no tecido adiposo favorecendo a entrada de AGLs para o fígado via veia porta hepática (Costa *et al.*, 2010).

No fígado, a hiperinsulinemia favorece a lipogênese *de novo* por fatores de transcrição ativados pela insulina, especialmente o *sterol regulatory element binding protein-1c* (SREBP-1c) (Utzschneider e Kahn, 2006; Postic e Girard, 2008). O SREBP1-c modula os genes relacionados na síntese dos ácidos graxos livres e dos triglicerídeos, envolvendo ACC (*acetil-coA carboxilase*), SCD (*stearoyl CoA desaturase*) e FAS (*fatty acid synthase*) (Schultz *et al.*, 2013). Esse processo é modulado pela insulina (Utzschneider e Kahn, 2006).

1.4 Resistência à insulina

O quadro de *RI* é uma condição de saúde em que os níveis normais de insulina são insuficientes para uma resposta normal à insulina nos adipócitos (células de gordura), nos miócitos e hepatócitos (Kodama *et al.*, 2007; Atlantis *et al.*, 2009). A resistência acontece somente em células dependentes de insulina. O transporte de glicose do meio extracelular para dentro da célula ocorre através de proteínas carreadoras de glicose (tipo GLUT) (Matsakas e Patel, 2009). Essas proteínas são armazenadas em vesículas dentro das células que, quando recebem um sinal químico proveniente das proteínas receptoras de insulina (que também se autofosfatam para desenvolver uma série de ligações em cadeia até a ativação da transcrição de novas proteínas transportadoras), se locomovem pelo citosol até a membrana citoplasmática e se fundem a ela, aumentando – por causa da maior quantidade de proteínas transportadoras – a absorção de glicose. Com esse aumento de proteínas do tipo GLUT na membrana da célula, a absorção de glicose ocorre aproximadamente 15 vezes mais rápido do que na ausência de insulina, conseguindo um efeito hipoglicemiante rápido e eficaz (Kivela *et al.*, 2008).

A *RI* (hormônio hipoglicemiante) consiste em uma falha no reconhecimento do hormônio por parte dos receptores de insulina. A causa pode ser tanto genética quanto por uma supersaturação de moléculas energéticas no organismo (ácidos

graxos, glicerol, glicose e principalmente a acetil CoA) que leva a uma desativação das proteínas receptoras de insulina (Ota *et al.*, 2007).

A *RI* está relacionada ao estilo de vida atual. Alguns fatores como tipo de dieta, prática de exercício, hábito do tabagismo e situações de estresse agudo provavelmente estão relacionados à *RI*. Basicamente sabemos que a dieta ideal para alterar o quadro de *RI* deveria reduzir a ingestão alimentar de gordura e aumentar o consumo de fibras, levando à diminuição da absorção intestinal de gordura. A prática de exercícios também é um fator relevante para o aumento da sensibilidade celular à insulina, pois está relacionado ao aumento da translocação do transportador de glicose em tecidos insulino-dependentes (GLUT-4) (Terada *et al.*, 2001).

1.5 Exercício físico

“Exercício físico” é como denominamos qualquer atividade física que mantém ou aumenta a aptidão física em geral e tem o objetivo de alcançar a saúde e também a recreação. A razão da prática de exercícios inclui:

- a) reforço da musculatura e do sistema cardiovascular;
- b) aperfeiçoamento das habilidades atléticas;
- c) perda de massa corporal.

Para muitos médicos e outros especialistas, exercícios físicos realizados de forma regular estimulam o sistema imunológico, ajudando na prevenção de doenças (como cardiopatias, *DM2*, etc.), moderam o colesterol, ajudando na prevenção da obesidade, e traz outros benefícios (Stampfer *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2001).

O exercício físico não é um componente do estilo de vida atual que, nas suas distintas modalidades (ginástica, desporto e educação física), constitui atividades vitais para a saúde, a educação, a recreação e o bem-estar do ser humano. O ideal para a saúde é que o exercício físico se torne um hábito na infância ou na adolescência, para não haver dificuldades de integrá-lo à vida adulta.

As consequências do sedentarismo para a saúde humana são nefastas e bem conhecidas. O sedentarismo está relacionado ao maior risco de aterosclerose e

suas consequências (angina, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico), aumento da obesidade, aparição de problemas como: hipertensão arterial, *DM2*, osteoporose, dislipidemia, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, depressão, ansiedade, além de aumento do risco de afecções osteomusculares e de alguns tipos de câncer de cólon e de mama (Hamilton *et al.*, 2007).

No presente estudo, utilizamos a modalidade do *HIT* (*High-Intensity Interval Training*). O *HIT* é uma forma avançada de treinamento intervalado, utilizando uma estratégia de períodos alternados de exercício anaeróbico intenso de curta duração, com períodos de recuperação menos intensos (Gremeaux *et al.*, 2012). Sessões do *HIT* podem variar de 4 a 30 minutos. Esses exercícios intensos de curta duração podem proporcionar uma melhor capacidade física, melhorando o metabolismo da glicose e a manipulação de gordura (Qiao *et al.*, 2006).

Uma sessão de *HIT* consiste muitas vezes em um período de aquecimento seguido de 3 a 10 repetições de exercícios de alta intensidade, separadas por exercício de baixa intensidade ou recuperação passiva. O exercício de alta intensidade deve ser feito próximo da intensidade máxima e não existe uma fórmula específica para o *HIT*. Um esquema comum de *HIT* envolve uma relação de 2:1 de trabalho para períodos de recuperação. Uma sessão completa de *HIT* pode ser considerada uma excelente maneira de maximizar um treino quando o tempo é um fator limitador, promovendo efeitos tão benéficos quanto os promovidos pelo exercício aeróbio (Weston *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Indução, com dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6, de componentes relacionados a *SMet* humana;
- Avaliação dos efeitos terapêuticos do exercício físico de alta intensidade e curta duração (modalidade natação) neste contexto.

2.2 Específicos

- Estudar as alterações estruturais em órgãos-alvo da obesidade (tecido adiposo, pâncreas e fígado) em animais obesos por dieta e submetidos ao exercício de alta intensidade e curta duração;
- Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício de alta intensidade e curta duração sobre o metabolismo da glicose, *RI*, perfil lipídico, perfil inflamatório, enzimas hepáticas, expressão de proteínas e expressão gênica;
- Avaliar a expressão das proteínas relacionadas na lipogênese e betaoxidação (por western blot e RT-PCR quantitativo).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e dietas

Os protocolos de manuseio e experimentação foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (número de protocolo CEA/041/2012). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os preceitos do "Guia para a utilização do laboratório de cuidados com os animais " (NIH Publication No. 85-23, revista em 1996, EUA). Os animais foram mantidos em suas próprias caixas (cinco animais por caixa), com temperatura ($21\pm 2^{\circ}$ C) e umidade ($60\pm 10\%$) controladas, ciclo claro/escuro (12 h claro/12 h escuro), com caixas ventiladas individualmente (Nexgen Ecoflo, Allentown, Inc., EUA). Os animais foram avaliados diariamente com relação às condições vitais e à alimentação.

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 3 meses de idade ($n = 40$) foram alimentados com 1 das 2 dietas a seguir:

- dieta padrão (76% das calorias eram provenientes dos carboidratos, 10% das gordura e 14% das proteínas) ($n=20$), ou
- dieta hiperlipídica (36% das calorias eram provenientes dos carboidratos, 50% das gordura e 14% das proteínas) ($n=20$).

As quantidades de vitaminas e minerais foram idênticas em ambas as dietas e seguiram as recomendações da AIN 93 (Reeves *et al.*, 1993). Após 12 semanas de intervenção dietética, os animais foram subdivididos em 4 grupos de acordo com as respectivas dietas e protocolo de exercício a que seriam submetidos:

- a) magro não treinado (LE-NT) ($n=10$),
- b) magro treinado (LE-T) ($n=10$),
- c) obeso não treinado (OB-NT) ($n=10$),
- d) obeso treinado (OB-T) ($n=10$).

Foram, então, submetidos ao protocolo de exercício com duração de 12 semanas, totalizando 24 semanas de experimento.

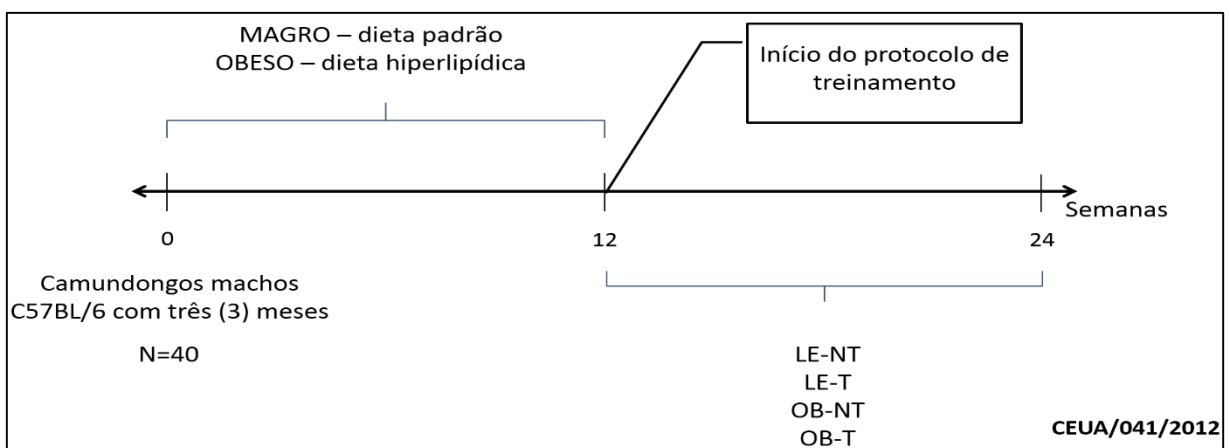
3.2 Protocolo de Treinamento

Os animais destinados ao exercício (treinados) passaram por um período de adaptação na piscina (dimensões: 40x30x80 cm), com água mantida à temperatura controlada ($32 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 2 dias, por 15 min diários, sem sobrecarga. Os animais não destinados ao exercício (não treinados) fizeram apenas essa adaptação para estarem submetidos ao mesmo ambiente do outro grupo.

Em um segundo momento, os animais treinados foram submetidos a um teste de número máximo de séries (TNM), composto por 20 seg de exercício ativo para 10 seg de recuperação passiva, com 10% da *MC* implementada na cauda do animal. O teste era interrompido quando o animal se mostrava incapaz de retornar à superfície para respirar depois de 10 seg (Casimiro-Lopes *et al.*, 2008).

No protocolo experimental estabeleceu-se o uso de 50% do TNM. A cada 2 semanas, aumentou-se o percentual da carga gradualmente, até alcançar 10% a 15% da *MC* atual do animal (*Fig. 1*). O protocolo de exercício foi realizado 3 vezes por semana com 12 semanas de duração.

Figura 1 - Desenho experimental



3.3 Massa corporal e ingestão alimentar

A *massa corporal (MC)* foi mensurada semanalmente desde a 12^a semana de vida até o final do experimento. A dieta foi oferecida diariamente (4g/animal), medindo-se o resto de comida não consumido e deixado na caixa, que era depois desprezado. Desse modo, controlamos a ingestão alimentar e calórica. A ingestão energética acumulada dos grupos foi calculada como a soma da ingestão calórica (kcal) por animal, antes e depois da aplicação do protocolo de exercício físico (ao final do experimento).

3.4 Teste oral de tolerância à glicose

Foi realizado no início e no final do experimento (24 h após a última sessão de exercício físico). Para tanto, glicose à 25% em solução salina estéril em uma dose de 1g/kg foi administrada oralmente (gavagem orogástrica), sendo este considerado o tempo zero.

A amostra de sangue foi coletada na veia da cauda (de uma pequena incisão na ponta da cauda) no tempo zero e nos seguintes minutos após a administração de glicose: 15, 30, 60 e 120 min. Usou-se o glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche Applied Science, Brasil).

O gráfico da evolução da glicemia foi analisado para o cálculo da "área sob a curva" (programa GraphPad Prism Versão 6.04 para Windows, San Diego, CA, EUA).

A *RI* foi estimada pelo cálculo do HOMA-IR (do inglês *homeostatic model assessment*, em português *Modelo de avaliação da Homeostase*) (Matthews *et al.*, 1985):

$$[(\text{insulinemia}), \text{ em } \mu\text{U/mL} \cdot (\text{glicemia}), \text{ em mmol/L}]/22,5$$

3.5 Análises bioquímicas plasmáticas

Colesterol total, triglicerídeos, LDL-C, HDL-C, glicose, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram medidos no plasma por método colorimétrico enzimático usando um espectrofotômetro automático e respectivos kits para análise (BIOCLIN, Quibasa, Belo Horizonte, Brasil).

Os níveis plasmáticos de insulina e marcadores inflamatórios como: *adiponectina*, *leptina*, resistina, *IL-6*, PAI-1 e MCP-1 foram analisados utilizando o multiplex (Biomarker Immunoassays for Luminex xMAP technology (Millipore, Billerica, MA, USA, cat. no. MADPK7107-M)). Os coeficientes de variação intraensaio e interensaio do painel de adipocitocinas plasmáticas de camundongos foram <6% e <11%, respectivamente.

3.6 Morfometria de adipócitos e ilhotas pancreáticas

Fragmentos do pâncreas e da gordura epididimária foram removidos, pesados e fixados em fixador recentemente preparado (1.27M formaldeído em tampão 0,1 M de fosfato de sódio, pH 7,2) durante 48 h à temperatura ambiente. Depois, as amostras foram processadas e incluídas em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e, finalmente, os blocos foram cortados com espessura nominal de 5 µm e corados com hematoxilina e eosina. O diâmetro médio dos adipócitos e das ilhotas foi medido por meio do software Imagem-Pro Plus (versão 7.03, Media Cybernetics, EUA), em fotomicrografias digitais aleatórias, considerando-se 50 adipócitos e 20 ilhotas por animal (formato TIFF, 24 bits, 1280 x 1024 pixels, câmera digital Infinity 1-5C (Lumenera Co. Ottawa, ON, Canadá), microscópio Leica DMRBE, Leitz Wetzlar, Alemanha) (Santos *et al.*, 2013).

3.7 Estereologia do fígado

Fragmentos de todos os lobos do fígado foram coletados e fixados em fixador preparado no dia (1.27M formaldeído em tampão 0,1 M de fosfato de sódio, pH 7,2) durante 48 h à temperatura ambiente. Depois disso, as amostras foram processadas e incluídas em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e, finalmente, os blocos

foram cortados com espessura nominal de 5 μm e corados com hematoxilina e eosina. Dez fotomicrografias digitais foram obtidas por animal para avaliação da *esteatose hepática* (formato TIFF, 24 bits, 1280 x 1024 pixels), câmera digital Infinity 1 -5C (Lumenera Co. Ottawa, ON, Canadá), microscópio Leica DMRBE (Leitz Wetzlar, Alemanha). Cinco campos microscópicos aleatórios por animal foram analisados. Um sistema-teste com 36 pontos (P_T) foi produzido pelo programa baseado na web STEPanizer (Tschanz *et al.*, 2011) e sobreposto às fotomicrografias.

Estimou-se a densidade de volume de esteatose hepática ($V_v[\text{esteatose}]$) como: $V_v[\text{esteatose}] = P_p[\text{esteatose}] / P_T$, onde P_p representa o número de pontos do sistema-teste contados na gordura intra-hepatócitos (Aguila *et al.*, 2003; Catta-Preta *et al.*, 2011).

3.8 Western blot

A expressão das proteínas de *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP-1c - Santa Cruz Biotechnology, sc-código 367, CA, USA), PPAR-*alfa* (Santa Cruz Biotechnology, sc-9000 código, CA, EUA), PPAR-*gama* (Santa Cruz Biotechnology, código sc- 7273, CA, EUA), transportador de glicose (GLUT4 - Millipore, cat # 07-1402, MA, EUA), FAS (fatty acid synthase - Santa Cruz Biotechnology, código sc-20140, CA, EUA) foi detectada por *imunoblotting* utilizando anticorpos policlonais de coelho. Aproximadamente 120 mg de fígado e de músculo esquelético foram homogeneizados em tampão de lise (pH 6,4) contendo inibidores de protease. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada com um kit de ensaio de proteínas BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Trinta microgramas de proteína foram separados por eletroforese num gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) e transferidos para uma membrana de PVDF (GE Healthcare BioSciences). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em solução salina tamponada com Tris (TBS) (Amershan Biosciences, Uppsala, Suécia) contendo 0,05% de Tween-20 (Bio Rad, CA, EUA) e, em seguida, incubadas durante a noite a 4°C com anti-SREBP-1c, anti-FAS, anti-PPAR-*alfa*, anti-PPAR-*gama*, anti-GLUT4.

Subsequentemente, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS contendo 0,05% de Tween-20 e incubadas com o anticorpo secundário durante 1 hora. A proteína estrutural β -actina (Santa Cruz Biotechnology, sc - código 81178, CA, EUA) foi obtida por extração das proteínas da membrana de PVDF do fígado e do músculo esquelético e foi utilizada para correção da expressão das proteínas mencionadas. As bandas foram detectadas por quimiluminescência, utilizando o kit de reagente ECL (GE Healthcare BioSciences) e obtido pelo sistema de imagens ChemiDoc (Bio Rad, EUA). A densidade dos sinais foi analisada usando a versão do software ImageJ 1.47q (Wyne Rasband, National Institutes of Health, EUA).

3.9 PCR quantitativo em tempo real

O RNA total foi extraído a partir de 50mg de fígado e 30mg do músculo esquelético, utilizando reagente Trizol (Invitrogen, CA, EUA). A quantificação do RNA foi determinada utilizando espectroscopia NanoVue (GE Life Sciences), e 1 mg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen). A síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada utilizando iniciadores Oligo (dT) para RNAm e Superscript III da transcriptase reversa (ambos da Invitrogen). O PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi realizado utilizando StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies, CA, USA) e o SYBR Green mix (Invitrogen). Primers para qPCR foram concebidos utilizando o software Primer3 on-line e estão indicados na Tabela 1. A *beta*-actina (β -actina) foi utilizada para normalizar a expressão dos genes selecionados.

As eficiências de RT-qPCR para o gene alvo e da β -actina foram aproximadamente iguais, e foram calculados a partir de séries de diluição de cDNA. As reações em tempo real de PCR foram realizadas como se segue: depois de uma pré-desnaturação e programa de ativação da polimerase (4 min a 95°C), 44 ciclos, cada um consistindo em 95°C durante 10 s e 60°C durante 15s foram seguidos por um programa de curva de fusão (60°C a 95°C, com taxa de aquecimento de 0.1°C/s). Os controles negativos consistiram em poços nos quais o cDNA foi substituído por água deionizadas. A relação de expressão relativa (RQ) de RNAm foi calculado pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, em que $-\Delta C_t$ expressa a diferença entre o número de ciclos (TC) dos genes-alvo e da β -actina.

3.10 Eutanásia

Na 24^a semana, 24 h após o último dia de treinamento físico, os animais foram mantidos em jejum por 6 h e foram profundamente anestesiados (pentobarbital sódico intraperitoneal, 150 mg/kg). As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca para análise bioquímica, centrifugadas a 120 g durante 15 min à temperatura ambiente e o plasma foi armazenado a -80°C até o dia do ensaio. A MC, bem como as massas de tecido adiposo, fígado e pâncreas foram corrigidas pelo comprimento da tíbia (Yin *et al.*, 1982).

3.11 Análise estatística

Os dados estão apresentados como a média e o erro padrão da média.

As amostras foram testadas quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias.

As diferenças entre os grupos foram testadas por análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak. Para todas as análises, um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (GraphPad Prism versão 6.04 para Windows, San Diego, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal

Desde a primeira semana de consumo da dieta experimental, houve diferença significativa na *MC* dos grupos magros e obesos (20%, $P<0,001$) que permaneceu até a 12^a semana do experimento. A principal razão para o aumento da *MC* foi a ingestão de dieta com alta densidade energética. A partir da 13^a semana e do início do protocolo de exercício, o grupo LE-T reduziu sua *MC* em comparação com o grupo LE-NT (11%, $P<0,001$), e também o grupo OB-T reduziu sua *MC* quando comparado com o OB-NT (11%, $P<0,001$) (Fig. 2).

4.2 Bioquímica e citocinas inflamatórias plasmáticas

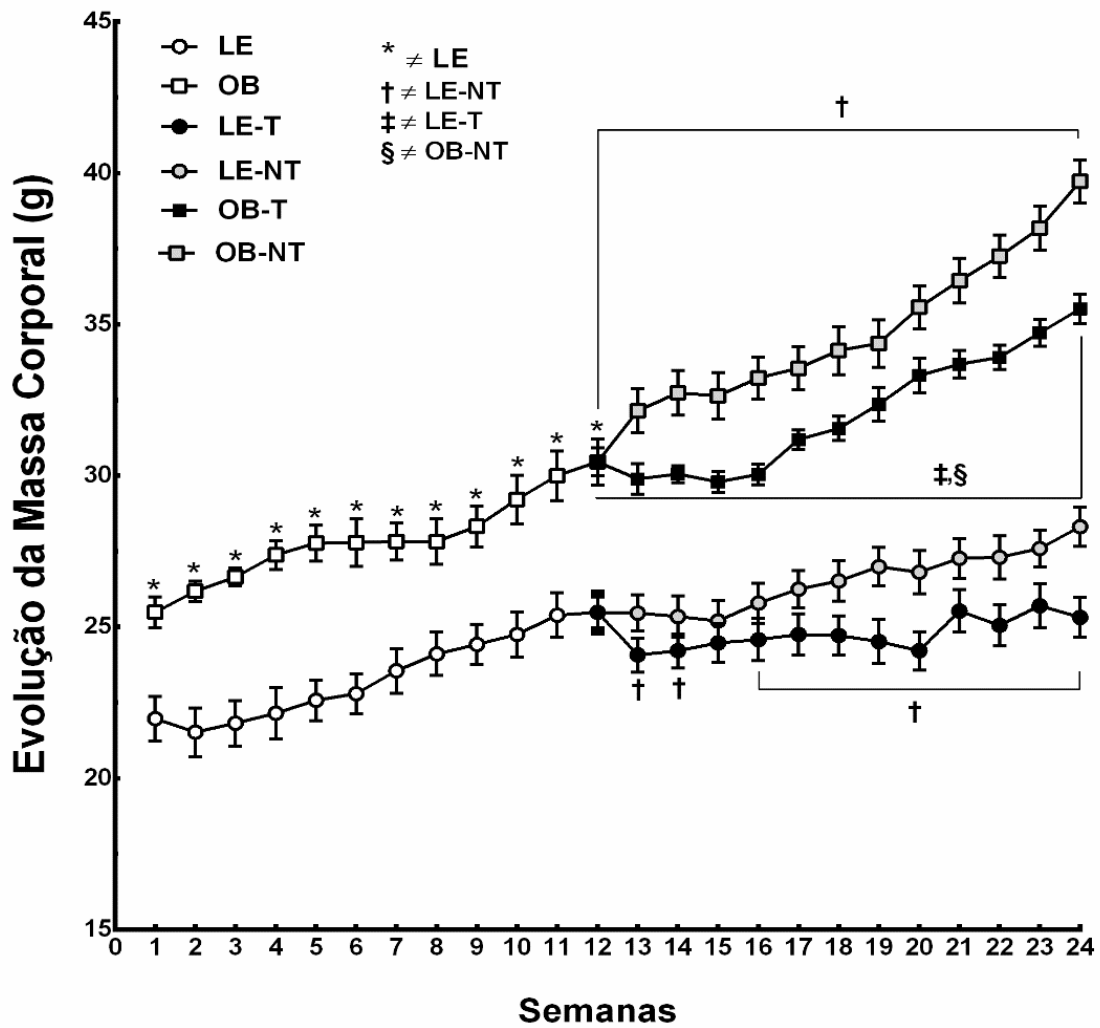
A Tabela 1 mostra os resultados da bioquímica e citocinas inflamatórias plasmáticas.

Em comparação com o grupo LE-NT, o grupo OB-NT teve aumento dos níveis de CT (91%), TG (84%), LDL-c (369%), AST (76%) e ALT (131%) ($P<0,001$). Além disso, todos esses dados foram significativamente menores no grupo OB-T em comparação ao grupo OB-NT ($P<0,001$).

Note-se que os camundongos tendem a ter um aumento dos níveis de HDL-c quando alimentados com uma dieta rica em gordura; mas o grupo LE-T, no presente estudo, mostrou um aumento efetivo dos níveis de HDL-c em comparação ao grupo LE-NT.

Os níveis de *adiponectina* no plasma foram menores nos grupos obesos (OB-NT e OB-T) em comparação aos grupos magros ($P<0,001$). Em relação aos efeitos, o treinamento de alta intensidade em natação, foi eficaz na redução dos valores das citocinas inflamatórias, mesmo no grupo OB-T, que continuou a se alimentar com a dieta rica em gordura ($P<0,001$, para todas as citocinas).

Figura 2 - Evolução da Massa Corporal



Legenda: Grupos: LE-NT, magro não treinado; LE-T, magro treinado; OB-NT, obeso não treinado; OB-T, obeso treinado. Quando indicado, houve uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) † LE-NT, ‡ LE-T, e § OB-NT (one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak). Os dados são apresentados como a média e o erro padrão da média.

Tabela 1: Bioquímica e perfil inflamatório plasmáticos.

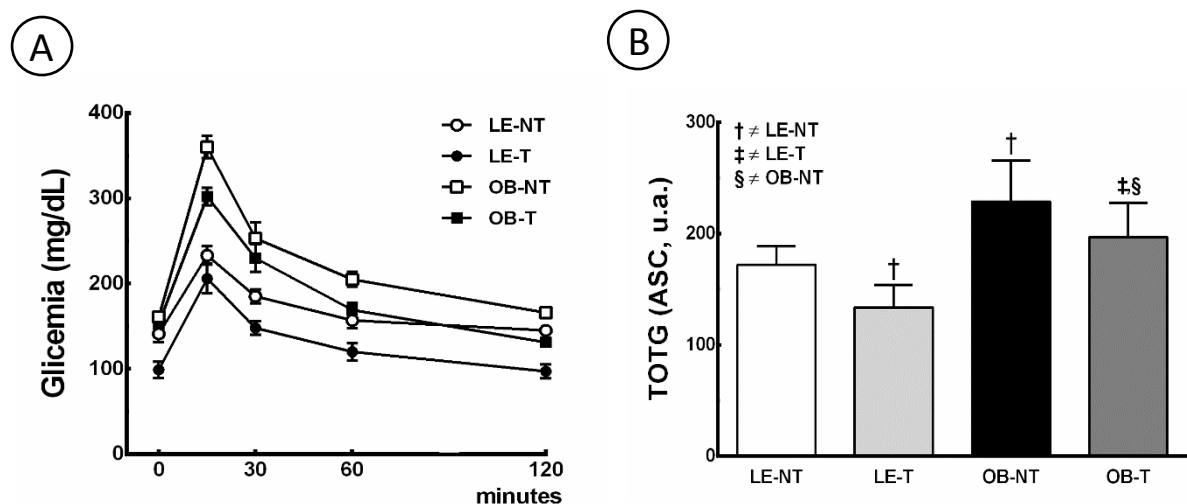
DADOS	GRUPOS			
	LE-NT	LE-T	OB-NT	OB-T
CT (mg/dl)	121,7±11,0	94,3±6,0 †	232,1±6,0 †	192,5±1,0 †,§
TG (mg/dl)	75,7±2,0	58,2±2,0 †	139,1±4,0 †	98,5±2,0 †,§
LDL-C (mg/dl)	13,0±2,0	8,0±2,0 †	61,0±3,0 †	23,0±2,0 †,§
HDL-C (mg/dl)	72,0±3,0	82,0±1,0 †	103,0±3,0 †	121,0±4,0 †,§
Glicemia (mg/dl)	120,0±2,0	98,0±2,0 †	156,0±6,0 †	126±3,0 †,§
Insulina (µU/ml)	18,6±3,4	11,8±3,0 †	42,3±3,8 †	25,1±3,1 †,§
HOMA-IR (a.u)	2,7±0,2	1,6±0,3 †	6,4 ±0,4 †	3,9±0,2 †,§
AST(U/L)	84,0±2,3	49,0±3,6 †	194,0±6,2 †	99,0±3,5 †,§
ALT (U/L)	34,0±2,2	10,0±1,6 †	61,0±3,2 †	35,0±3,3 †,§
Adiponectina (µg/ml)	13,8±0,9	18,3±0,9 †	9,6±1,0 †	13,4±0,9 †,§
IL-6 (pg/ml)	12,5±1,9	4,3±1,3 †	33,2±2,2 †	12,9±2,0 †,§
Resistina (10 ² pg/ml)	13,2±1,4	8,1±1,5 †	29,8±1,5 †	18,7±1,4 †,§
MCP-1 (pg/ml)	17,8±1,3	12,4±1,6 †	33,8±2,0 †	23,0±3,9 †,§
Leptina (10 ³ pg/ml)	15,4±1,7	7,2±1,6 †	34,9±1,8 †	15,9±1,7 †,§
PAI-1 (10 ² pg/ml)	11,7±1,1	6,0±0,7 †	22,5±1,1 †	9,8±0,7 †,§

Legenda: Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. Símbolos representam diferença significativa em comparação com: † LE-NT, ‡ LE-T, e § OB-NT, $P < 0,05$, *one-way* ANOVA, pós-teste de Holm-Sidak. Grupos: LE (magro), OB (obeso), NT (não treinado), T (treinado). Abreviaturas: *IL-6* (Interleucina-6), MCP (proteína quimiotática de monócitos), PAI (inibidor do ativador do plasminogênio).

4.3 Teste oral de tolerância à glicose

Antes do início do protocolo de exercício, a concentração de glicose plasmática aumentou no grupo OB (39%, $P < 0,003$) devido ao consumo da dieta rica em gordura, provocando uma forma de *RI*, em comparação ao grupo LE. No final do protocolo de exercício, os grupos treinados mostraram uma área sob a curva diminuída (LE-T, 23%, $P < 0,01$ e OB-T, 16%, $P < 0,01$), quando comparado aos grupos não treinados, respectivamente. Isso sugere que o exercício foi eficaz em reduzir a *RI* provocada pela dieta rica em gordura (no presente caso, o grupo OB-T). (Fig. 3)

Figura 3 - Teste oral de tolerância à glicose.

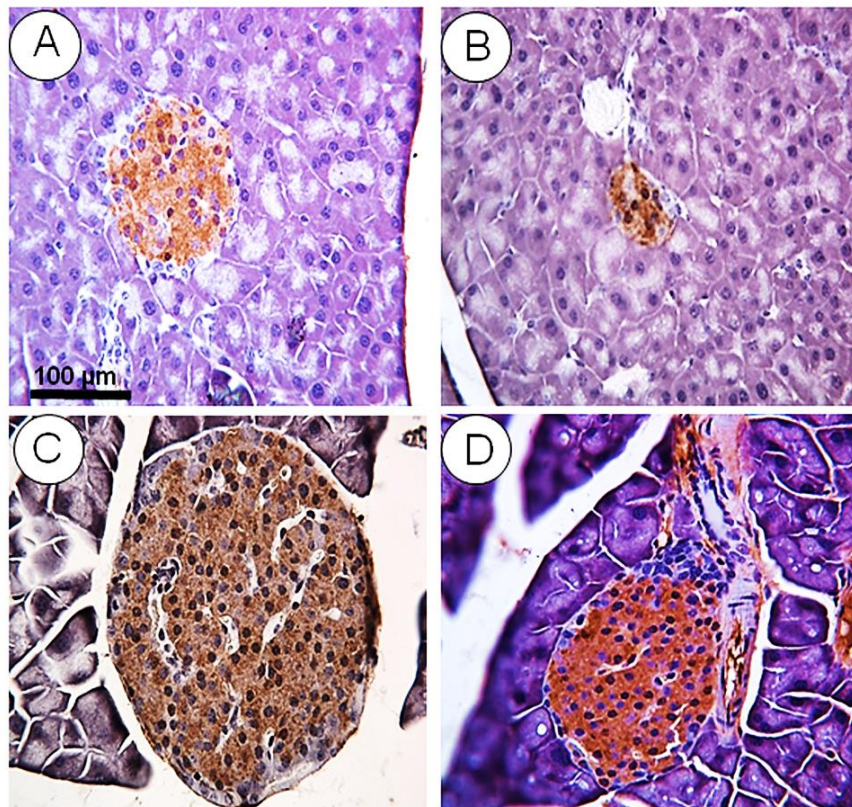


Legenda: (A) Análise de 120 minutos, e (B) comparando a área sob a curva (AUC) em unidades arbitrárias (UA). Grupos: LE-NT, magro não treinado; LE-T, magro treinado; OB-NT, obeso não treinado; OB-T, obeso treinado. Quando indicado, houve uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) † LE-NT, ‡ LE-T, e § OB-NT (*one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak).

4.4 Ilhotas pancreáticas

O consumo excessivo da dieta hiperlipídica promoveu hipertrofia das ilhotas pancreáticas no grupo obeso (46%, $P<0,01$), corroborando os resultados do teste oral de tolerância à glicose, com uma hiperfunção da secreção de insulina (119%, $P<0,001$) e uma diminuição da captação de glicose. O efeito protetor do exercício promoveu uma redução no diâmetro das ilhotas nos grupos LE-T (40%, $P<0,01$) e OB-T (22%, $P<0,01$) e reduziu a secreção de insulina nos grupo LE-T (35%, $P<0,01$) e OB-T (31%, $P<0,001$), em comparação com os respectivos grupos não treinados (Fig. 4).

Figura 4 – Ilhotas pancreáticas



Legenda: Representantes dos grupos marcados com imunohistoquímica de insulina (células *beta*): (A) grupo LE-NT, (B) grupo LE-T; (C) grupo OB-NT; (D) grupo OB-T.

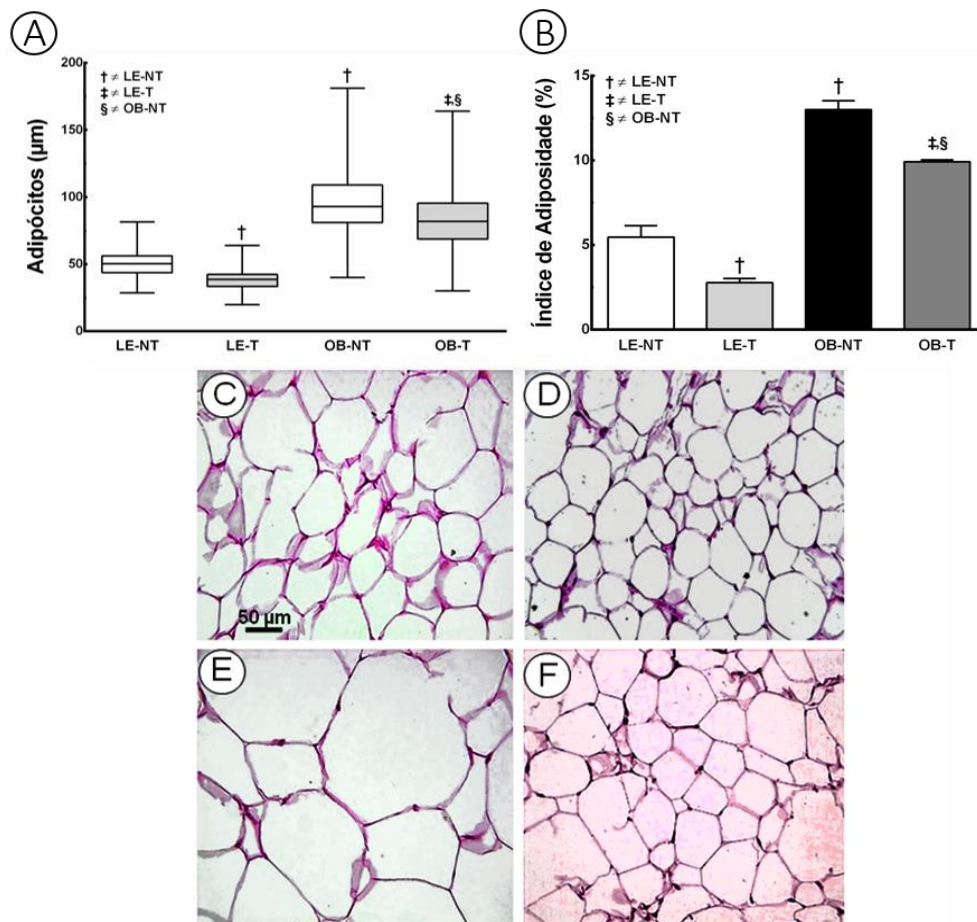
4.5 Índice de adiposidade e diâmetro dos adipócitos

A dieta rica em gordura promoveu um aumento no diâmetro dos adipócitos no grupo OB-NT quando comparado com LE-NT (85%, $P < 0,001$). No fim do experimento, o grupo LE-T reduziu o diâmetro médio dos adipócitos (23%, $P < 0,01$), em comparação com o seu respectivo grupo não treinado.

O mesmo aconteceu com o grupo OB-T em relação ao OB-NT, com uma redução de 12% no diâmetro dos adipócitos ($P < 0,01$).

O índice de adiposidade aumentou significativamente no grupo OB-NT (137%, $P < 0,001$), em comparação com o grupo LE-NT, e diminuiu nos grupos treinados (LE-T; 49%, $P < 0,001$ e OB-T; 24%, $P < 0,001$) (Fig. 5).

Figura 5 – Análise do tecido adiposo



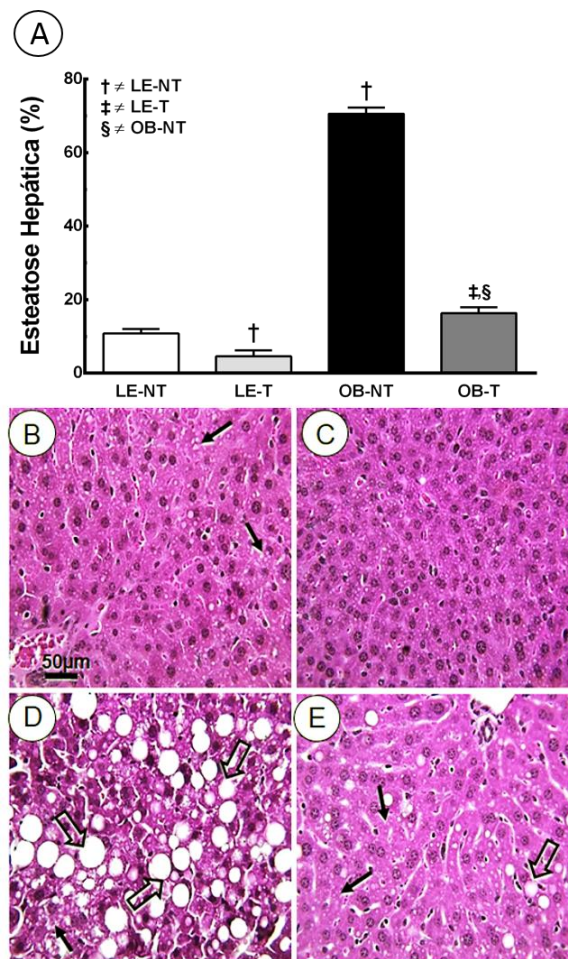
Legenda: (A) Distribuição de adipócitos em relação ao tamanho dos grupos, (B) índice de adiposidade. Quando indicado, houve uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) † LE-NT, ‡ LE-T, e § OB-NT (*one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak). As fotomicrografias de (C) a (F) são representativas de uma amostra de adipócitos dos grupos: (C) LE-NT, (D) LE-T, (E) OB-NT, (F) OB-T.

4.6 Esteatose hepática

No grupo OB-NT, a estrutura do fígado foi caracterizada por uma infiltração de gordura e pela presença de macro e microvesículas intra-hepatócitos, caracterizando a esteatose hepática.

No primeiro momento, a dieta provocou um acúmulo excessivo de gordura no fígado no grupo OB (554%, $P < 0,001$), quando comparado com o grupo LE. Ao final do experimento, o grupo LE-T apresentou menos esteatose (57%, $P < 0,05$) em comparação com LE-NT. Essa redução da esteatose hepática foi também observada no grupo OB-T (77%, $P < 0,001$) quando comparado ao grupo OB-NT (Fig. 6).

Figura 6 – Análise de esteatose hepática

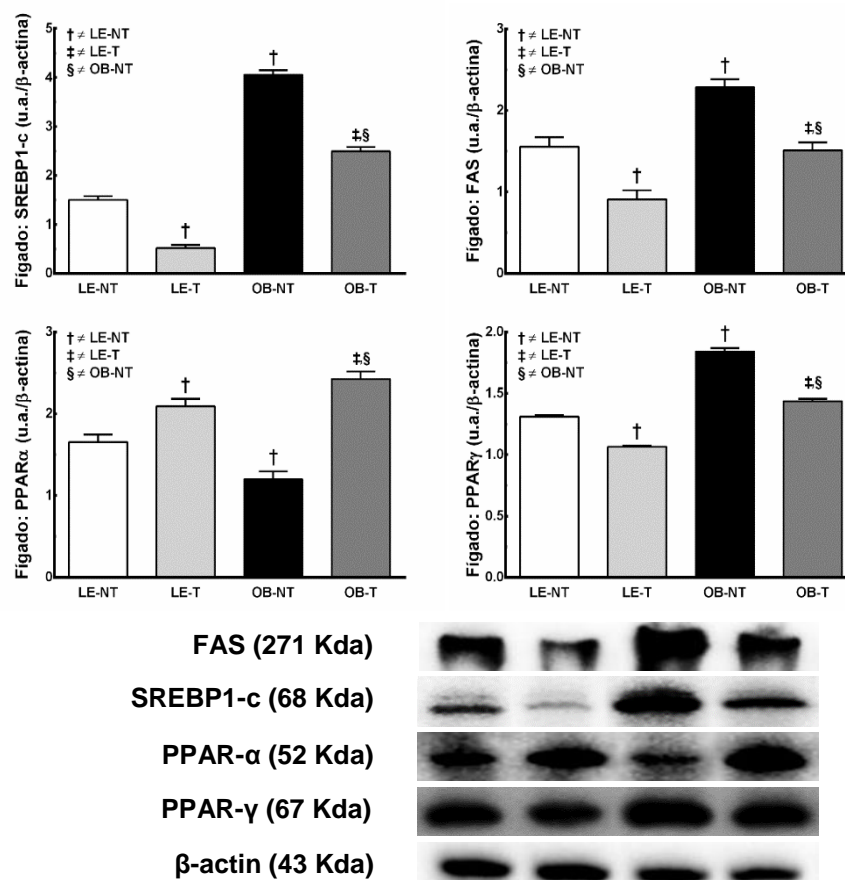


Legenda: (A) A densidade de volume da esteatose estimada nos grupos (média e erro padrão da média). Quando indicado, houve uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) † LE-NT, ‡ LE-T, e § OB-NT (*one-way ANOVA* e pós-teste de Holm-Sidak). Esteatose macro (setas cheias) e microvesicular (setas vazias) nos grupos (B) LE-NT (muito pouca gordura nos hepatócitos), (C) LE-T (muito pouca gordura nos hepatócitos); (D) OB-NT (este grupo mostra a grande quantidade de gordura nos hepatócitos), (E) OB-T (gordura moderada nos hepatócitos).

4.7 Western blot (fígado): FAS, SREBP1-c e PPARs

O grupo OB-NT apresentou aumento da expressão da FAS. Esta expressão foi reduzida nos grupos treinados (LE-T, 41%, $P < 0,001$ e OB-T; 34%, $P < 0,001$). A expressão de SREBP1-c foi maior no grupo OB-NT (170%, $P < 0,001$) quando comparado com o grupo LE-NT. Os grupos treinados apresentaram uma expressão reduzida de SREBP1-c (LE-T; 66%, $P < 0,001$ e OB-T; 39%, $P < 0,001$), quando comparados com os grupos não treinados. A expressão hepática de PPAR-*alfa* foi reduzida no grupo OB-NT e aumentada nos grupos treinados: LE-T (26%, $P < 0,001$) e OB-T (102%, $P < 0,001$). A expressão de PPAR-*gama* foi aumentada nos grupos não treinados (LE-NT, 19%, $P < 0,001$ e OB-NT, 22%, $P < 0,001$). Não foi observada diferença na expressão de β -actina das membranas. (Fig. 7)

Figura 7 - Análise por Western Blot do fígado (bandas representativas das proteínas são mostradas na parte inferior da figura)

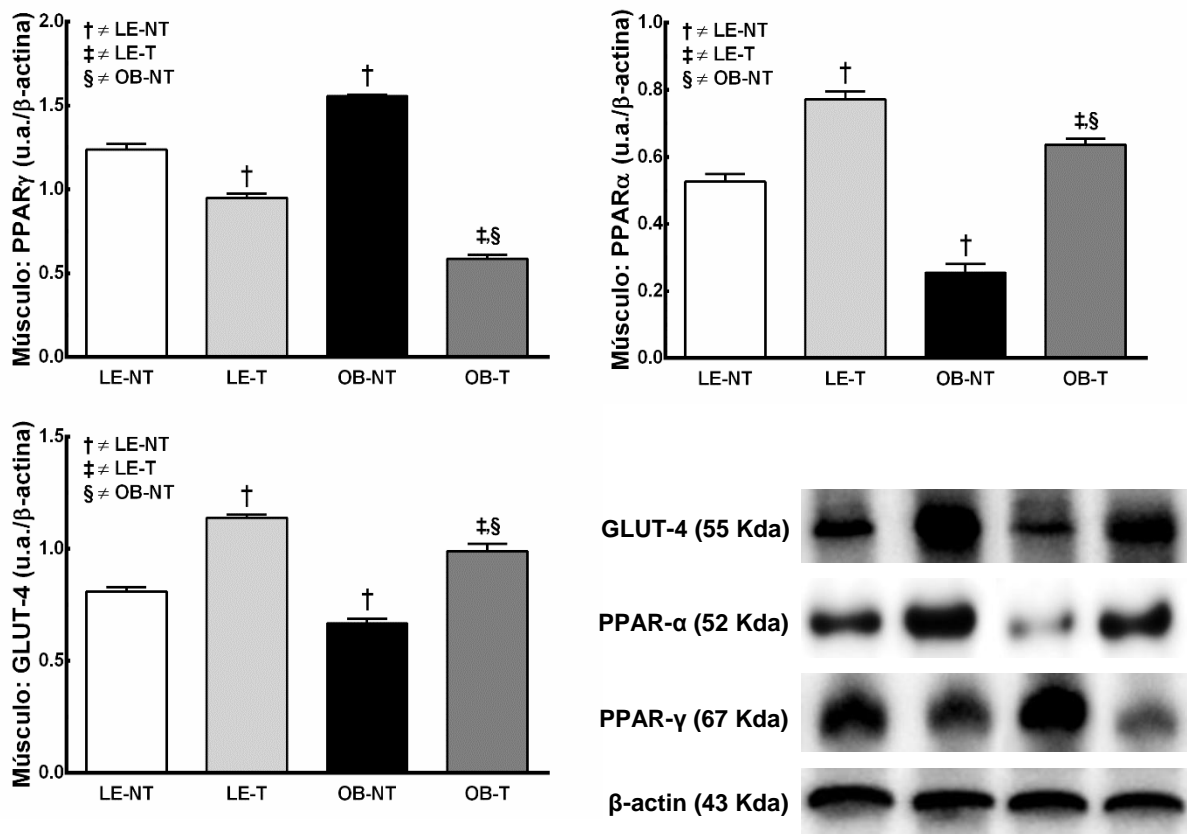


Legendas: Os valores são apresentados como média e o erro padrão da média. Quando indicado, houve uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) † LE-NT, ‡ LE-T, e § OB-NT (*one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak). Sterol regulatory element-binding proteins-1c (SREBP-1C); Fatty acid synthase (FAS); Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-*alfa*); PPAR-*gama*.

4.8 Western blot (músculo esquelético): GLUT-4 e PPAR

A expressão de PPAR-*alfa* foi reduzida no grupo OB-NT (52%, $P < 0,001$), e nos grupos treinados aumentaram significativamente (LE-T; 47%, $P < 0,001$ e OB-T; 150%, $P < 0,001$). A expressão de PPAR-*gama* foi aumentada nos grupos não treinados (LE-NT, 23%, $P < 0,001$ e OB-NT, 62%, $P < 0,001$). A expressão de GLUT4 foi maior nos grupos treinados quando comparados com os não treinados (LE-T; 48%, $P < 0,001$ e OB-T; 41%, $P < 0,001$). Não foi observada diferença na expressão de β -actina das membranas. (Fig. 8)

Figura 8 - Análise por Western Blot do músculo esquelético (bandas representativas das proteínas são mostradas na parte lateral da figura)

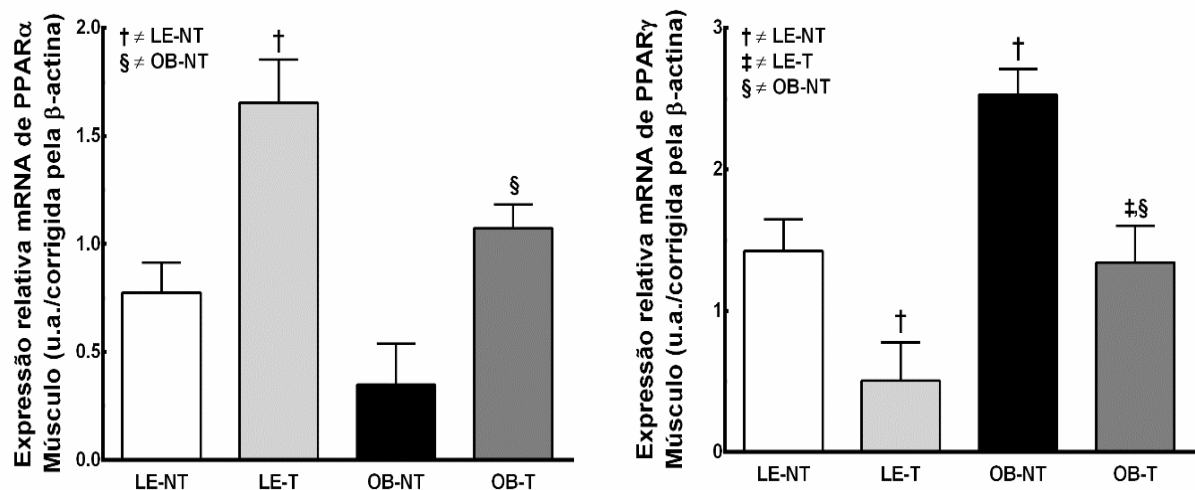


Legenda: Os valores são apresentados como a média e o erro padrão da média. Quando indicado, houve uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) † LE-NT, ‡ LE-T, e § OB-NT (one-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak). Glucose transporter member 4 (GLUT4); Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-*alfa*); PPAR-*gama*.

4.9 RT-PCR quantitativo do fígado e músculo esquelético

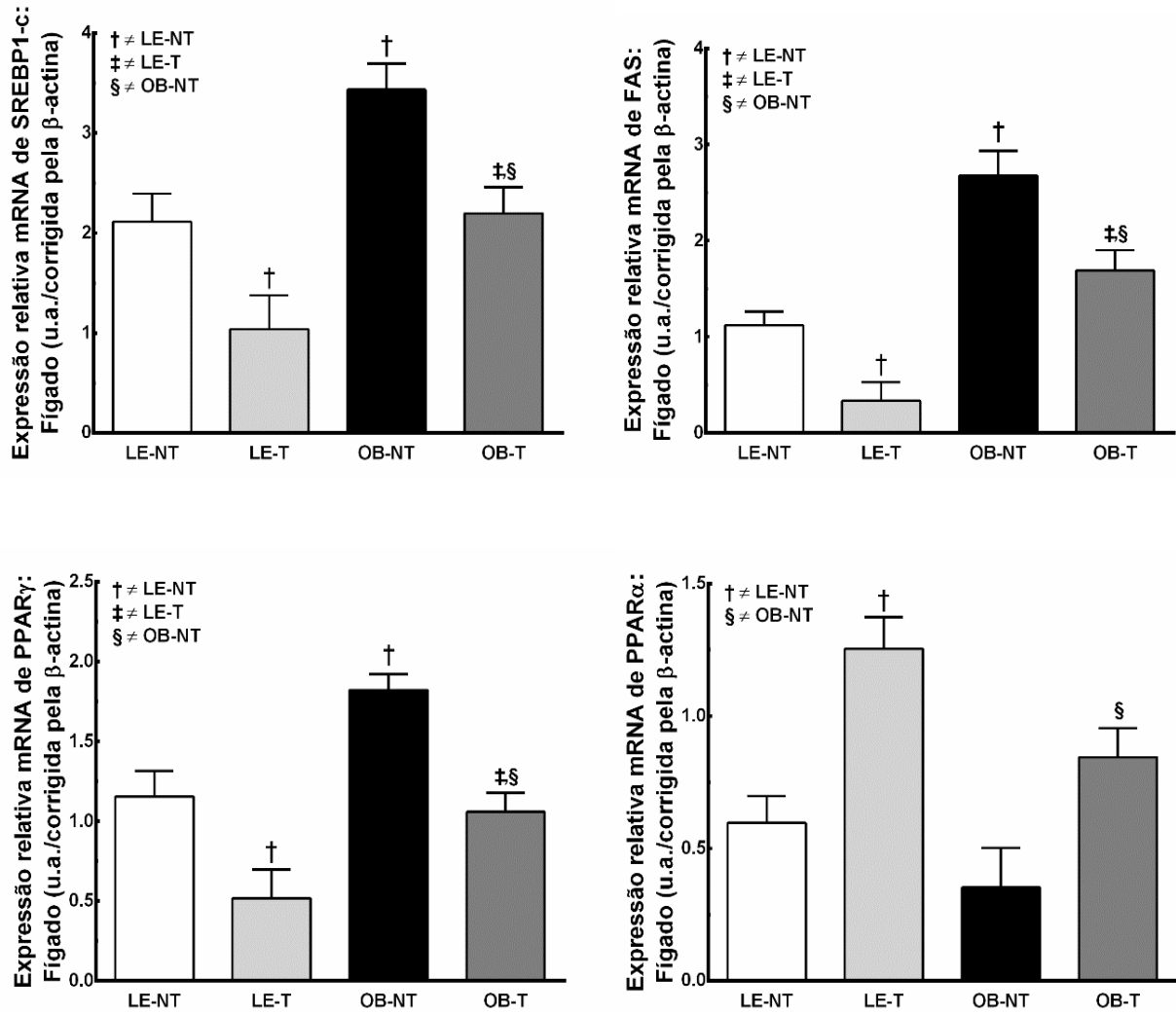
No tecido muscular esquelético, a expressão de RNAm do PPAR-*alfa* foi reduzida no grupo OB-NT, e nos grupos treinados foi aumentada (LE-T; 113%, $P < 0,01$ e OB-T; 207%, $P < 0,01$). A expressão de RNAm do PPAR-*gama* foi aumentada nos grupos não treinados (LE-NT, 64%, $P < 0,01$ e OB-NT; 47%, $P < 0,01$). Analisando o fígado, o grupo OB-NT mostrou um aumento na expressão do RNAm da FAS, sendo essa expressão reduzida nos grupos treinados (LE-T, 70%, $P < 0,01$ e OB-T; 37%, $P < 0,01$). A expressão do RNAm da SREBP1-c foi maior no grupo OB-NT (51%, $P < 0,01$), quando comparado com o grupo LE-NT. Os grupos treinados apresentaram uma expressão reduzida (LE-T; 51%, $P < 0,01$ e OB-T, 36%, $P < 0,01$) quando comparado com os grupos não treinados. A expressão de RNAm do PPAR-*alfa* foi reduzida no grupo OB-NT, e foi aumentado nos grupos treinados: LE-T (110%, $P < 0,001$) e OB-T (140%, $P < 0,01$). A expressão de RNAm do PPAR-*gama* foi aumentada nos grupos não treinados (LE-NT, 55%, $P < 0,01$ e OB-NT, 42%, $P < 0,01$). (Figuras 9 e 10)

Figura 9 - Expressões relativas de RNAm no músculo esquelético (corrigidos por β -actina)



Legenda: Os valores são apresentados como média e o erro padrão da média. Quando indicado, houve uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) † LE-NT, ‡ LE-T, e § OB-NT (*one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-*alfa*); PPAR-*gama*.

Figura 10 - Expressões relativas de RNAm do fígado (corrigidos por β -actina)



Legenda: Os valores são apresentados como a média e o erro padrão da média. Quando indicado, houve uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) † LE-NT, ‡ LE-T, e § OB-NT (*one-way* ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak). Sterol regulatory element-binding proteins-1c (SREBP-1C); Fatty acid synthase (FAS); Peroxisome proliferator-activated receptors PPAR-*alfa*; PPAR-*gama*.

5 DISCUSSÃO

O modelo animal escolhido no presente estudo tem susceptibilidade fenotípica para o desenvolvimento de obesidade e outros componentes relacionados com a *SMet* de seres humanos quando alimentados com uma dieta de alto teor de gordura (Gallou-Kabani *et al.*, 2007; Fraulob *et al.*, 2010). De fato, observou-se que, enquanto o grupo magro (LE) não mostrou mudanças significativas na biometria corporal, no metabolismo da glicose e no perfil pró-inflamatório, o grupo obeso (OB) mostrou todas essas alterações, caracterizando o modelo animal de *SMet*.

Com a progressão da aplicação do protocolo de exercício, as alterações no grupo OB foram progressivamente atenuadas e também foram melhoradas no grupo LE. O benefício do *HIT* nos grupos OB e LE foi relacionado com a redução significativa da gordura corporal. Com isso houve melhora no metabolismo da glicose/*RI* e no perfil pró-inflamatório.

Sabemos que há benefícios promovidos pelo exercício (caráter aeróbico, esteira ou natação) na *RI* e esteatose hepática (Fujimoto *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2012). Na obesidade induzida por dieta, o exercício diminui os efeitos deletérios da dieta (Jimenez-Pavon *et al.*, 2013). O protocolo de alta intensidade parece promover melhora superior na aptidão e melhora semelhante em alguns fatores de “risco cardiometabólico”, em comparação com o exercício moderado contínuo, quando realizado por indivíduos saudáveis ou em pacientes clínicos (Kessler *et al.*, 2012). Entretanto, esta comparação entre *HIT* e outros tipos de exercício não fez parte do objetivo do presente estudo.

A relação entre a qualidade de vida e a inatividade contribui para o desenvolvimento de várias comorbidades da *SMet*, tais como a obesidade e *RI/DM2* (Babraj *et al.*, 2009). O tratamento da obesidade é multifatorial, mas principalmente leva em consideração as terapias farmacológica e nutricional, cirurgia e atividade física (Hansen *et al.*, 2010). O objetivo do exercício é recuperar a saúde, garantindo ao indivíduo melhora na qualidade de vida através da perda de *MC* gradual e reversão de alterações metabólicas e hormonais, além de agir como um anti-inflamatório natural (Petersen e Pedersen, 2005).

É sabido que o exercício tem papel anti-inflamatório e melhora a sensibilidade à insulina (Shing *et al.*, 2013). Isso concorda com os resultados do presente estudo, pois foram demonstrados os benefícios do treinamento de alta intensidade em animais obesos, mesmo se mantendo o consumo contínuo de uma dieta hiperlipídica.

A *SMet* é uma indutora potente de pró-inflamação. O exercício tem um papel relevante no aumento da indução sistêmica de citocinas com propriedades anti-inflamatórias (Kessler *et al.*, 2012). No presente estudo, a ação do treinamento de alta intensidade foi significativa para a diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias MCP-1, *IL-6*, PAI-1, *leptina* e *resistina*. Além disso, nossos achados com o *HIT* concordam com as observações relatadas na literatura, sobre o aumento da concentração de *adiponectina* em resposta ao exercício de alta intensidade e da redução da porcentagem de gordura corporal (Mitrou *et al.*, 2011).

O efeito da oxidação alterada da gordura tem importância na regulação da energia pelo sistema nervoso central e no desenvolvimento de importantes comorbidades da obesidade, incluindo a inflamação sistêmica, *R//DM2* e doenças cardiovasculares (Rogge, 2009). É bom enfatizar que, nos casos extremos de obesidade (obesidade mórbida), o tecido adiposo subcutâneo libera *IL-6*, a qual pode, em seguida, mediar a *RI* no músculo esquelético (Mitrou *et al.*, 2011). Nesses casos, apesar de haver um aumento concomitante da secreção de *leptina* pelo tecido adiposo subcutâneo, o nível de *leptina* aparentemente não está associado com a sensibilidade à insulina no metabolismo da glicose muscular (Tsuchiya *et al.*, 2013).

Associado à *RI* sistêmica, o consumo de uma dieta rica em gordura leva a um aumento da secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas, sem associação com um aumento da qualidade de produção de insulina (Terada *et al.*, 2001). No presente estudo, observou-se hipertrofia de ilhotas no grupo OB, associado ao aumento na imunodensidade das células-*beta*. Isto concorda com a literatura que relata uma produção excedente de insulina nos casos de obesidade, mas essa insulina não atua na captação de glicose circulante, levando à hiperglicemia e à hiperinsulinemia basal (Postic e Girard, 2008), que também foi observado em nossos resultados. Mais do que isso, verificou-se uma atenuação da hipertrofia das ilhotas e

da imunodensidade das células-*beta* em animais obesos submetidos ao *HIT*, associou-se a uma atenuação da *RI* desses animais.

O exercício aumenta a taxa de captação de glicose porque as necessidades do músculo esquelético estão aumentadas. Esse efeito é semelhante à ação da insulina sobre a glicose e sobre o mecanismo de estimulação da absorção de glicose, que envolve a translocação dos transportadores de glicose (no caso do músculo esquelético, o GLUT4) para a membrana plasmática e túbulos transversais. Assim, o período de pós-exercício é caracterizado por um aumento da sensibilidade à insulina para a captação de glicose no músculo (Younossi, 2008).

O exercício tem efeitos significativos sobre os mecanismos independentes de insulina utilizados para aumentar a absorção de glicose no músculo esquelético, como acontece nos indivíduos com *DM2* (Wei *et al.*, 2008). Segundo os resultados do presente estudo, com o uso de *HIT*, houve uma expressão maior de GLUT4 nos animais treinados em comparação com os animais não treinados.

Temos que considerar os efeitos nocivos da obesidade sobre o fígado. O desenvolvimento de esteatose hepática está associado ao desequilíbrio de vários processos celulares relacionados à sinalização da insulina, incluindo o aumento do fluxo de ácidos graxos livres no fígado (lipólise), betaoxidação, estresse oxidativo, etc (Tsekouras *et al.*, 2008). Essas alterações estão relacionadas com a elevação das enzimas hepáticas, ALT e AST (Browning e Horton, 2004).

A redução da *MC*, principalmente com a correção da obesidade central conseguida através da combinação de medidas dietéticas e com o aumento da atividade física, corresponde ao "padrão ouro" de manutenção da doença não alcoólica do fígado gorduroso. Isso é muito importante porque, se não levada a sério, esta alteração do fígado pode evoluir para a esteatohepatite, que corresponde à rota que termina na cirrose hepática e no câncer do fígado (Farrell e Larter, 2006). A doença não alcoólica do fígado gorduroso está fortemente associada com *DM2* e obesidade abdominal e sua prevalência mundial aumentou dramaticamente nos últimos anos, sendo projetada para ser a principal etiologia para transplante de fígado na próxima década (Anstee *et al.*, 2013).

No contexto da *RI*, a lipogênese no fígado é aumentada pela ativação de genes lipogênicos, tais como acetil-CoA carboxilase, FAS e esteroil-CoA desaturase 1,

todos eles ativados pela SREBP-1c (Pyper *et al.*, 2010; Cintra *et al.*, 2012). Contrariamente, a expressão de PPAR-*alfa* correlaciona-se a uma elevada atividade de betaoxidação mitocondrial (Anstee e Goldin, 2006). O exercício físico melhora praticamente todos os indicadores hepáticos quando há esteatose hepática associada à obesidade (Rector *et al.*, 2008; Schultz *et al.*, 2012; Centis *et al.*, 2013).

Durante o exercício, a maior fonte de energia para o trabalho muscular vem da glicose do fígado. A regularidade da prática do exercício físico reduz significativamente o quadro de esteatose hepática quando associado a uma correção simples da dieta (com redução da quantidade de gordura) (Racil *et al.*, 2013).

O exercício é um benefício em potencial na prevenção do agravamento da esteatose hepática, independentemente da perda de *MC*, devido ao aumento da utilização de gordura como energia (Fujimoto *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2012). Em relação à oxidação de gordura, o *HIT* tem um efeito pós-exercício maior do que o treinamento de baixa a moderada intensidade (Magkos *et al.*, 2008). Além disso, o *HIT* reduz a taxa de secreção de VLDL pelo fígado de homens sedentários (Malhi e Gores, 2008). Os nossos resultados demonstraram que o *HIT* levou a uma redução significativa da esteatose hepática e das enzimas hepáticas, mesmo nos animais que foram alimentados com uma dieta rica em gordura de forma continuada.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os achados do estudo atual reforçam a importância do exercício de alta intensidade na modalidade de natação como uma abordagem não farmacológica para o controle da resistência insulínica, no controle da glicemia e na atenuação da esteatose hepática.

O exercício de alta intensidade leva à perda de *MC* e é capaz de atenuar os efeitos adversos causados pela ingestão crônica de uma dieta rica em gordura, mesmo com a ingestão continuada dessa dieta, melhorando as enzimas do fígado e o perfil inflamatório.

REFERÊNCIAS

1. Aguila MB, Pinheiro Ada R, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003; 23:363-370.
2. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366:1059-1062.
3. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87:1-16.
4. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10.1038/nrgastro.2013.41.
5. Atlantis E, Martin SA, Haren MT, Taylor AW, Wittert GA. Inverse associations between muscle mass, strength, and the metabolic syndrome. *Metabolism* 2009; 58:1013-1022.
6. Babraj JA, Volllaard NB, Keast C, Guppy FM, Cottrell G, Timmons JA. Extremely short duration high intensity interval training substantially improves insulin action in young healthy males. *BMC Endocr Disord* 2009; 9:3.
7. Bagry HS, Raghavendran S, Carli F. Metabolic syndrome and insulin resistance: perioperative considerations. *Anesthesiology* 2008; 108:506-523.
8. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114:147-152.
9. Casimiro-Lopes G, Alves SB, Salerno VP, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. Maximum acute exercise tolerance in hyperthyroid and hypothyroid rats subjected to forced swimming. *Horm Metab Res* 2008; 40:276-280.
10. Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch* 2011; 459:477-485.
11. Centis E, Marzocchi R, Suppini A, Dalle Grave R, Villanova N, Hickman IJ, Marchesini G. The role of lifestyle change in the prevention and treatment of NAFLD. *Curr Pharm Des* 2013; 19:5270-5279.
12. Cintra DE, Ropelle ER, Vitto MF, Luciano TF, Souza DR, Engelmann J, Marques SO, Lira FS, de Pinho RA, Pauli JR, De Souza CT. Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: the role of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Life Sci* 2012; 91:395-401.

13. Costa CS, Hammes TO, Rohden F, Margis R, Bortolotto JW, Padoin AV, Mottin CC, Guaragna RM. SIRT1 transcription is decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with severe hepatic steatosis. *Obes Surg* 2010; 20:633-639.
14. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010; 51:679-689.
15. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43:S99-S112.
16. Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Santos CF, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46:212-223.
17. Fujimoto E, Machida S, Higuchi M, Tabata I. Effects of nonexhaustive bouts of high-intensity intermittent swimming training on GLUT-4 expression in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci* 2010; 60:95-101.
18. Gallou-Kabani C, Vige A, Gross MS, Rabes JP, Boileau C, Larue-Achagiotis C, Tome D, Jais JP, Junien C. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity* 2007; 15:1996-2005.
19. Gentile CL, Frye MA, Pagliassotti MJ. Fatty acids and the endoplasmic reticulum in nonalcoholic fatty liver disease. *Biofactors* 2011; 37:8-16.
20. Gentile CL, Pagliassotti MJ. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 2008; 19:567-576.
21. Gibala MJ, Jones AM. Physiological and performance adaptations to high-intensity interval training. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2013; 76:51-60.
22. Gremeaux V, Drigny J, Nigam A, Juneau M, Guilbeault V, Latour E, Gayda M. Long-term lifestyle intervention with optimized high-intensity interval training improves body composition, cardiometabolic risk, and exercise parameters in patients with abdominal obesity. *Am J Phys Med Rehabil* 2012; 91:941-950.
23. Hamilton MT, Hamilton DG, Zderic TW. Role of low energy expenditure and sitting in obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 2007; 56:2655-2667.
24. Hansen KB, Vilsboll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. Reduced glucose tolerance and insulin resistance induced by steroid treatment, relative physical inactivity, and high-calorie diet impairs the incretin effect in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:3309-3317.

25. Heinonen MV, Laaksonen DE, Karhu T, Karhunen L, Laitinen T, Kainulainen S, Rissanen A, Niskanen L, Herzig KH. Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19:626-633.
26. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 2001; 345:790-797.
27. Iellamo F, Caminiti G, Sposato B, Vitale C, Massaro M, Rosano G, Volterrani M. Effect of High-Intensity interval training versus moderate continuous training on 24-h blood pressure profile and insulin resistance in patients with chronic heart failure. *Intern Emerg Med* 2013; 10.1007/s11739-013-0980-4.
28. Jimenez-Pavon D, Sese MA, Huybrechts I, Cuenca-Garcia M, Palacios G, Ruiz JR, Breidenassel C, Leclercq C, Beghin L, Plada M, Manios Y, Androutsos O, Dallongeville J, Kafatos A, Widhalm K, Molnar D, Moreno LA. Dietary and lifestyle quality indices with/without physical activity and markers of insulin resistance in European adolescents: the HELENA study. *Br J Nutr* 2013; 10.1017/S0007114513001153:1-7.
29. Johnson MS, Jumbo-Lucioni P, Watts AJ, Allison DB, Nagy TR. Effect of dairy supplementation on body composition and insulin resistance in mice. *Nutrition* 2007; 23:836-843.
30. Kessler HS, Sisson SB, Short KR. The potential for high-intensity interval training to reduce cardiometabolic disease risk. *Sports Med* 2012; 42:489-509.
31. Kivela R, Silvennoinen M, Lehti M, Jalava S, Vihko V, Kainulainen H. Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthy and diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2008; 7:13.
32. Kodama S, Shu M, Saito K, Murakami H, Tanaka K, Kuno S, Ajisaka R, Sone Y, Onitake F, Takahashi A, Shimano H, Kondo K, Yamada N, Sone H. Even low-intensity and low-volume exercise training may improve insulin resistance in the elderly. *Intern Med* 2007; 46:1071-1077.
33. Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietilainen KH, Yki-Jarvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:3490-3497.
34. Kotronen A, Yki-Jarvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:27-38.
35. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 2008; 7:45-56.

36. Ma X, Zhu S. Metabolic syndrome in the prevention of cardiovascular diseases and diabetes--still a matter of debate? *Eur J Clin Nutr* 2013; 67:518-521.
37. Magkos F, Tsekouras YE, Prentzas KI, Basioukas KN, Matsama SG, Yanni AE, Kavouras SA, Sidossis LS. Acute exercise-induced changes in basal VLDL-triglyceride kinetics leading to hypotriglyceridemia manifest more readily after resistance than endurance exercise. *J Appl Physiol* (1985) 2008; 105:1228-1236.
38. Malhi H, Gores GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic Fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28:360-369.
39. Marques CM, Motta VF, Torres TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43:467-475.
40. Marques CM, Nascimento FA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Menopause* 2006; 13:87-95.
41. Martinez JA. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc Nutr Soc* 2000; 59:337-345.
42. Matsakas A, Patel K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol* 2009; 24:611-629.
43. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.
44. Messier C, Whately K, Liang J, Du L, Puissant D. The effects of a high-fat, high-fructose, and combination diet on learning, weight, and glucose regulation in C57BL/6 mice. *Behav Brain Res* 2007; 178:139-145.
45. Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Boutati E, Komesidou V, Papakonstantinou A, Raptis SA, Dimitriadis G. Skeletal muscle insulin resistance in morbid obesity: the role of interleukin-6 and leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011; 119:484-489.
46. Morrison JA, Friedman LA, Gray-McGuire C. Metabolic syndrome in childhood predicts adult cardiovascular disease 25 years later: the Princeton Lipid Research Clinics Follow-up Study. *Pediatrics* 2007; 120:340-345.
47. Motta VF, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on body mass and skeletal muscle capillaries/myocyte ratio in C57BL/6 mice fed high-fat diet. *Int J Morphol* 2012; 30:205-212.
48. Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Akahori H, Misu H, Sakurai M, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S. Insulin resistance accelerates a

- dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2007; 132:282-293.
49. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985) 2005; 98:1154-1162.
 50. Popkin BM, Doak CM. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. *Nutr Rev* 1998; 56:106-114.
 51. Postic C, Girard J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* 2008; 34:643-648.
 52. Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal* 2010; 8:e002.
 53. Qiao D, Hou L, Liu X. Influence of intermittent anaerobic exercise on mouse physical endurance and antioxidant components. *Br J Sports Med* 2006; 40:214-218.
 54. Racil G, Ben Ounis O, Hammouda O, Kallel A, Zouhal H, Chamari K, Amri M. Effects of high vs. moderate exercise intensity during interval training on lipids and adiponectin levels in obese young females. *Eur J Appl Physiol* 2013; 10.1007/s00421-013-2689-5.
 55. Reaven GM, Chen YD. Role of abnormal free fatty acid metabolism in the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 1988; 85:106-112.
 56. Rector RS, Thyfault JP, Morris RT, Laye MJ, Borengasser SJ, Booth FW, Ibdah JA. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:G619-626.
 57. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.
 58. Rogge MM. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biol Res Nurs* 2009; 10:356-373.
 59. Santos CF, Souza-Mello V, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. Quantitative morphology update: image analysis. *Int J Morphol* 2013; 31:23-30.
 60. Sato Y, Nagasaki M, Kubota M, Uno T, Nakai N. Clinical aspects of physical exercise for diabetes/metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77 Suppl 1:S87-91.

61. Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64:273-282.
62. Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci* 2013; 14:21873-21886.
63. Shing CM, Webb JJ, Driller MW, Williams AD, Fell JW. Circulating adiponectin concentration and body composition are altered in response to high-intensity interval training. *J Strength Cond Res* 2013; 27:2213-2218.
64. Sinaiko AR, Steinberger J, Moran A, Prineas RJ, Vessby B, Basu S, Tracy R, Jacobs DR, Jr. Relation of body mass index and insulin resistance to cardiovascular risk factors, inflammatory factors, and oxidative stress during adolescence. *Circulation* 2005; 111:1985-1991.
65. Stampfer MJ, Hu FB, Manson JE, Rimm EB, Willett WC. Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle. *N Engl J Med* 2000; 343:16-22.
66. Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, Hayman L, Lustig RH, McCrindle B, Mietus-Snyder ML, American Heart Association Atherosclerosis H, Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Y, Council on Cardiovascular N, Council on Nutrition PA, Metabolism. Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2009; 119:628-647.
67. Strasser B. Physical activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1281:141-159.
68. Terada S, Yokozeki T, Kawanaka K, Ogawa K, Higuchi M, Ezaki O, Tabata I. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001; 90:2019-2024.
69. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 2011; 243:47-59.
70. Tsekouras YE, Magkos F, Kellas Y, Basioukas KN, Kavouras SA, Sidossis LS. High-intensity interval aerobic training reduces hepatic very low-density lipoprotein-triglyceride secretion rate in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:E851-858.
71. Tsuchiya M, Manabe Y, Yamada K, Furuichi Y, Hosaka M, Fujii NL. Chronic exercise enhances insulin secretion ability of pancreatic islets without change in insulin content in non-diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430:676-682.

72. Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:4753-4761.
73. Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294:R673-680.
74. Weston KS, Wisloff U, Coombes JS. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 2013; 10.1136/bjsports-2013-092576.
75. Whyte LJ, Ferguson C, Wilson J, Scott RA, Gill JM. Effects of single bout of very high-intensity exercise on metabolic health biomarkers in overweight/obese sedentary men. *Metabolism* 2013; 62:212-219.
76. Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 1982; 243:H941-947.
77. Younossi ZM. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28:2-12.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/041/2012 sobre “Benefícios do treinamento físico de intensidade progressiva e curta duração em indicadores metabólicos e do estado REDOX em camundongos C57BL/6 expostos à dieta hiperlipídica”, sob a responsabilidade de Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 15/06/2012. Este certificado expira em 15/06/2016.

Rio de Janeiro, 15 de Junho de 2012.

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof.^a Adj. do Depo. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ

Matrícula 24745507-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br

ANEXO B – Termo de submissão do artigo científico à publicação

Manuscript #	3793
Current Revision #	0
Submission Date	2013-12-23 09:33:20
Current Stage	Initial QC
Title	High-intensity interval training (swimming) significantly improves the adverse metabolism and comorbidities in diet-induced obese mice
Running Title	High-intensity interval training and obesity
Manuscript Type	Full Paper
Manuscript Comment	<p>On behalf of the authors, I submit the manuscript entitled "Beneficial effects of high-intensity interval training (swimming) in diet-induced obese mice" for publishing. The authors accept responsibility for content of the manuscript. The submitting author should declare that the co-authors have read the manuscript and approved its submission to BJMR. The authors disclose they have no financial interest or commercial sponsor for this work.</p> <p>I suggest, as reviewers, the following four names:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Åke Sjöholm, Karolinska Institutet, Department of Clinical Science and Education, Södersjukhuset, Stockholm, 11883, Sweden: ake.sjoholm@ki.se 2. Fabio Marra, Dipartimento di Medicina Interna, University of Florence, Viale Morgagni 85, Florence, I-50134, Italy. E-mail: f.marra@dmi.unifi.it 3. Christian K. Roberts, Ph.D., Exercise and Metabolic Disease Research Laboratory, Translational Sciences Section, UCLA School of Nursing, 700 Tiverton Avenue, Los Angeles, CA 90095; E-mail: croberts@ucla.edu. 4. Vincent Gremeaux, Montreal Heart Institute Cardiovascular and Prevention Center (ÉPIC) and "Université de Montréal", 5055, St-Zotique Street East, Montreal, Quebec H1T 1N6, Canada vincent.gremeaux@orange.fr
Corresponding Author	Carlos Mandarim-de-Lacerda (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)
Contributing Authors	Victor Motta , Marcia Aguilã
Abstract	<p>Controlling obesity and other comorbidities in the population is a challenge in modern society. The aim of this study is to assess the impact of high-intensity interval training (HIT) in the context of diet-induced obesity in animal model. C57BL/6 mice were fed one of two diets: standard chow (Lean group - LE) or a high-fat diet (Obese group - OB). After twelve weeks, the animals were divided into non-trained groups (LE-NT and OB-NT) and trained groups (LE-T and OB-T), and began an exercise protocol. High-intensity interval training leads to significant decreases in body mass, glycemia and oral glucose tolerance, total cholesterol, triglycerides, low-density lipoprotein cholesterol, aspartate transaminase and alanine aminotransferase in the liver in the trained groups compared to the non-trained groups. Additionally in the trained groups, the exercise protocol improves the insulin immunodensity in the islets, reduces inflammatory cytokine levels, the adiposity and the hepatic steatosis. HIT improves beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha and reduces lipogenesis and PPAR-gamma levels in the liver. In skeletal muscle, HIT also improves PPAR-alpha and glucose transporter-4 and reduces PPAR-gamma levels. The present findings reinforce the notion that HIT is relevant as a non-pharmacological approach to control insulin resistance, glycemia, and hepatic steatosis. In conclusion, HIT leads to weight loss and can attenuate the adverse effects caused by chronic ingestion of a high-fat diet, despite a continuous intake of this diet, by improving the liver enzymes and the inflammatory profile.</p>
Section Editor	Not Assigned
Key Words	Exercise training, Insulin resistance, Nonalcoholic fatty liver disease, beta oxidation, lipogenesis, molecular biology
Subject Areas	Biomedical Sciences/Experimental Biology
Conflict of Interest	No, there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
Publication Charges	CML