



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

## **Efeito de diferentes intensidades de treinamento em modelo de obesidade experimental**

**Aluna:** Zulmária Rezende Ramos de Freitas

**Orientadora:** Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

**UBERLÂNDIA – 2014**



**Efeito de diferentes intensidades de treinamento em modelo de  
obesidade experimental**

Zulmária Rezende Ramos de Freitas

**Orientador:** Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para a obtenção do título  
de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)

Uberlândia - MG  
Julho – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

F866e      Freitas, Zulmária Rezende Ramos de, 1988-  
2014      Efeito de diferentes intensidades de treinamento em modelo de  
obesidade experimental / Zulmária Rezende Ramos de Freitas. - 2014.  
77 f. : il.

Orientadora: Françoise Vasconcelos Botelho.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Stress oxidativo -  
Teses. I. Botelho, Françoise Vasconcelos. II. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III.  
Título.

---

CDU: 577.1



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

## **Efeito de diferentes intensidades de treinamento em modelo de obesidade experimental**

**ALUNA: Zulmária Rezende Ramos de Freitas**

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente: Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho**

**Examinadores: Prof. Dr. Guilherme Moraes Puga (UFU)**

**Profa. Dra. Etel Rocha Vieira (UFVJM)**

**Data da Defesa: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_**

As sugestões da comissão examinadora e as normas PPGGB para o formato da tese foram contempladas

---

**Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho**

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, a força maior que rege todas as minhas realizações e por mais esta conquista;
- A Professora Françoise pela orientação neste trabalho, pela compreensão e paciência diante das minhas limitações e por ter me dado oportunidade de fazer parte do seu grupo o que me possibilitou grande aprendizado e aquisição de conhecimentos;
- A professora Nádia, pela sua amizade, por ter me acolhido ainda na iniciação científica, ter acreditado no meu potencial e estimulado meu crescimento pessoal, acadêmico/profissional;
- Ao Professor Foued, pelos conhecimentos transmitidos e pela contribuição em minha formação científica;
- A minha família, principalmente, minha mãe e meu pai, por serem exemplos de caráter, luta e dedicação, por construírem e manterem uma família tão linda, além do papel fundamental pelo suporte, amor e carinho;
- As amigas Nathallie, Janaína e Maria Carolina, por estarem presentes nos momentos mais difíceis e serem parte da minha história;
- A todos queridos amigos do LABIBI que também colaboraram e me apoiam sempre que foi necessário; obrigada também pela amizade, pelo agradável convívio, pelos conhecimentos adquiridos e também pelos momentos de lazer, em especial a Hélen e a Renata;
- Ao meu grande parceiro nessa caminhada acadêmica, Leandro, com quem dividi dificuldades, frustrações, angústias, mas também muito aprendizado; à sua parceria, carinho e amizade. Foi menos difícil com você!
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica (INGEB/UFU) por essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

## **Sumário**

<i>APRESENTAÇÃO</i> .....	12
<i>INTRODUCTION</i> .....	15
<i>CAPÍTULO 1</i> .....	17
1 - Obesidade.....	18
2 – Epidemiologia da obesidade .....	20
3 - Obesidade, dieta e transição nutricional.....	21
4 - Obesidade e exercício .....	23
5 - Modelos experimentais de obesidade.....	24
6 - Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidant.....	25
6.1 – Estresse oxidativo e exercício .....	28
6.2 – Estresse oxidativo e obesidade.....	29
7 - Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) .....	30
8 - Referências.....	31
<i>CAPÍTULO 2</i> .....	39
1. Introdução .....	42
2. Métodos .....	43
3. Resultados .....	51
4. Discussão.....	53
5. Conclusão .....	54
6. Referências .....	55
<i>ANEXOS</i> .....	70

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1.</b> Desenho experimental.....	60
<b>Figura 2.</b> Análise do ganho de peso semanal (A) e ganho de peso acumulado (B).....	61
<b>Figura 3.</b> Análise histológica do perímetro (A) e da área (B) de adipócitos do tecido adiposo. Tecido SEX-DP (C), SEX-DH (D), EXB-DP (E), EXB-DH (F), EXM-DP (G) e EXM-DH (H). Lente de 10 vezes.....	62
<b>Figura 4.</b> Análise histológica hepática, em lente de 40x: SEX-DP (A), SEX-DH (B), EXB-DP (C), EXB-DH (D), EXM-DP (E) e EXM-DH (F).....	63
<b>Figura 5.</b> Dano oxidativo hepático. Peroxidação lipídica – TBARS (A); dano proteico – proteína carbonilada (B).....	64
<b>Figura 6.</b> Defesa anti-oxidante hepática. Atividade da Catalase (A); Atividade anti-oxidante total - FRAP (B).....	65
<b>Figura 7.</b> Dano oxidativo muscular. Peroxidação lipídica – TBARS (A); dano proteico – proteína carbonilada (B).....	66
<b>Figura 8.</b> Defesa anti-oxidante muscular. Atividade da Catalase (A); Atividade anti-oxidante total - FRAP (B).....	67

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Classificação de peso pelo IMC.....	19
<b>Tabela 2.</b> Circunferência abdominal e risco de complicações metabólicas associadas com obesidade em homens e mulheres caucasianos.....	19

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Composição (g) das dietas.....	68
<b>Tabela 2.</b> Proporção calórica das dietas.....	68
<b>Tabela 3.</b> Peso corporal e relativo de tecidos.....	69
<b>Tabela 4.</b> Perfil lipídico fígado.....	69

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CAT – Catalase

DCNT – Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DH – Dieta Hiperlipídica

DHGNA – Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

dL – decilitro

DP – Dieta Padrão

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ERON – espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

EXB – Exercício de baixa intensidade

EXM – Exercício de moderada intensidade

FRAP – Habilidade do plasma em reduzir ferro, do inglês *ferric reducing hability of plasma*

GPX – Glutationa Peroxidase

g – gramas

GSH – Glutationa Reduzida

HCl – Ácido Clorídrico

$H_2O_2$  – Peróxido de Hidrogênio

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC – Índice de Massa Corporal

kcal – Quilocaloria

mg – miligrama

mL - mililitro

mm – milímetro

NaCl – Cloreto de Sódio

nm – Nanômetros

nmol – nanomol

$^1\text{O}_2$  – Oxigênio *Singlet*

$\cdot\text{O}_2^-$  – Ânion Superóxido

$\cdot\text{OH}$  – Radical Hidroxila

OMS – Organização Mundial de Saúde

rpm – Rotação por minuto

SEX – Sem exercício

SOD – Superóxido Dismutase

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *tiobarbituric acid reactive substances*

TCA – Ácido Tricloroacético

$\mu\text{m}$  – Micrômetros

$\mu\text{L}$  – Microlitro

# **APRESENTAÇÃO**

O sedentarismo e o consumo de dietas hipercalóricas e/ou hiperlipídicas são, hoje, os dois principais fatores exógenos responsáveis pelo aumento expressivo da obesidade na população mundial. A literatura destaca que 95% dos casos de sobre peso/obesidade estão relacionados ao balanço energético positivo e que o fator genético isoladamente não é causa da obesidade. Mesmo apresentando algum desarranjo fisiológico e/ou metabólico, hábitos alimentares adequados e a prática regular de exercícios físicos são capazes de evitar e tratar a obesidade. Diante dos dados epidemiológicos atuais, este problema de saúde pública pode tornar-se ainda mais preocupante nos próximos anos, e os gastos públicos serem cada vez maiores.

Ao comparar indivíduos eutróficos e obesos, o estresse oxidativo é maior na população obesa, aparentemente, devido a fatores característicos desses pacientes como a hipercolesterolemia, o metabolismo anormal no tecido adiposo ou a excessiva liberação de citocinas inflamatórias. Assim, o aumento da produção de pró oxidantes, em detrimento dos antioxidantes, pode sobre carregar o organismo e promover o estresse oxidativo crônico. Além disso, há também evidências de que a obesidade está associada à redução da expressão de várias proteínas antioxidantes, contribuindo efetivamente para o estresse oxidativo.

Fatores exógenos e endógenos podem levar à produção das espécies reativas de oxigênio (EROs). Representam o resultado da excitação do O<sub>2</sub> para formar oxigênio singlet (¹O<sub>2</sub>) ou da redução do O<sub>2</sub> pela citocromo oxidase nas mitocôndrias, que pela transferência de um, dois e três elétrons, originando, respectivamente, radical superóxido (O<sub>2</sub>⁻), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (•OH). Por serem extremamente reativas, níveis elevados de EROS podem causar danos ao DNA, às proteínas e aos lipídios. Tais danos estão relacionados às alterações celulares que podem acarretar necrose ou apoptose, além de sinalizar ativação gênica de eventos patológicos que, até então, estavam silenciados.

O aumento de mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) relaciona-se ao excesso de peso devido a sua estreita relação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas. Está bem documentado que o exercício físico e a dieta equilibrada estão relacionados a muitos benefícios à saúde, incluindo riscos reduzidos de desenvolvimento de

DCNT. No entanto, ainda é preciso elucidar qual a intensidade ideal do exercício na obesidade e quais os efeitos isolados do sedentarismo e da dieta hiperlipídica em um contexto sistêmico. Sendo assim, este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito de diferentes intensidades de exercício, da dieta hiperlipídica e da dieta comercial no estresse oxidativo muscular e hepático de camundongos.

A apresentação da dissertação foi dividida em capítulos, conforme as normas do Instituto de Genética e Bioquímica e a formatação seguiu as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT. No capítulo 1, é apresentada uma revisão bibliográfica do assunto. No capítulo 2, mostramos os métodos utilizados, os resultados obtidos e a discussão sob a forma de um artigo, que será submetido a uma revista científica indexada.

## ***INTRODUCTION***

A sedentary lifestyle and the consumption of a high fat diet are the two exogenous factors responsible for the increase in obesity in the world population. About 95% of cases of overweight / obesity are related to positive energy balance. The genetic factor alone is not the cause of obesity. Even with some physiological or metabolic derangement, proper eating habits and regular physical exercise are able to prevent and treat obesity.

Comparing obese population with normal weight, obese have higher oxidative stress than normal weight. Apparently, because of characteristic conditions of these patients: hypercholesterolemia, abnormal metabolism in adipose tissue or excessive release of inflammatory cytokines. The increased production of pro-oxidants instead of antioxidants, can overload the body and promote chronic oxidative stress. There is also evidence that obesity is associated with reduced expression of several proteins antioxidants effectively contributing to the oxidative stress.

Exogenous and endogenous factors can lead to the production of reactive oxygen species (ROS). They represent the result of excitation of O<sub>2</sub> to form singlet oxygen (1O<sub>2</sub>) or reduction of O<sub>2</sub> by cytochrome oxidase in mitochondria, that the transfer of one, two and three electrons, originating, respectively, superoxide (O<sub>2</sub><sup>•</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and hydroxyl radical (• OH). To be extremely reactive, high levels of ROS can cause damage to DNA, proteins and lipids. Such damages are related to cellular changes that can lead to necrosis or apoptosis, and gene activation signal of pathological events that, until then, were silenced.

The increased mortality from chronic diseases is related to overweight because of the relationship with the development of cardiovascular and metabolic diseases. It is well documented that physical exercise and a balanced diet are related to many health benefits, including reduced risk of developing chronic diseases.

The dissertation was divided into chapters according to the standards of the Institute of Genetics and Biochemistry and formatting followed the rules of the Brazilian Technical Standards Association, ABNT. In Chapter 1, we present a literature review of the subject. In chapter 2 we show the methods used, the results and the discussion in the form of an article to be submitted to an indexed journal.

# **CAPÍTULO 1**

## **Fundamentação Teórica**

## 1 - Obesidade

De acordo com *Stedman's Medical Dictionary* (2000), doença pode ser definida por processos que culminem na interrupção, cessação, ou desordem na função corporal, sistêmica ou orgânica. Também pode ser caracterizada usualmente por pelo menos dois dos três critérios: agentes etiológicos reconhecidos; grupo de sinais e sintomas identificados; ou consistentes alterações anatômicas.

Reconhecida oficialmente como doença (Greenway and Smith, 2000), a obesidade é definida como um estado patológico caracterizado pelo acúmulo excessivo de gordura (Martí et al., 2001). A doença pode ser causada por múltiplos e complexos fatores, porém o balanço positivo de energia entre ingestão e gasto calórico, parece ser responsável por 95% dos casos (Dámaso, 2009).

A influência do genótipo na etiologia desta desordem pode ser atenuado ou exacerbado por fatores não-genéticos, como o ambiente externo e interações psicossociais que atuam sobre mediadores fisiológicos de gasto e consumo energético (Francischetti et al., 2001; Lofrano-Prado et al., 2011). Isso enfatiza o balanço energético como principal responsável pelo estabelecimento da obesidade. Mesmo apresentando algum desarranjo fisiológico/metabólico, hábitos alimentares adequados e prática regular de exercícios físicos são capazes de evitar e tratar a obesidade (Dámaso et al., 2006). É consenso que o fator genético, isoladamente, não é a causa da obesidade (Rosini, Silva e Moraes, 2012).

O índice de massa corporal (IMC) e a medida da circunferência abdominal (tabelas 1 e 2, respectivamente) têm sido amplamente utilizados na avaliação do excesso de peso e da obesidade abdominal (Rezende, 2010). Segundo os pontos de corte recomendados, o risco de morbidade em homens e mulheres adultos eleva-se à medida que o indivíduo migra da categoria de IMC normal (IMC: 18,5 a 24,9kg/m<sup>2</sup>) para a categoria de sobre peso (IMC: 25,0 a 29,9kg/m<sup>2</sup>) ou obesidade (IMC  $\geq$  30kg/m<sup>2</sup>), e quando apresentam a medida de circunferência abdominal maior ou igual a 94 e 80 cm e/ou quando a relação cintura-quadril é maior ou igual a 0,9 e 0,85, para homens e mulheres respectivamente (ABESO, 2009/2010).

Tabela 1 - Classificação de peso pelo IMC<sup>12</sup>(D)

Classificação	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Risco de comorbidades
Baixo peso	< 18,5	Baixo
Peso normal	18,5-24,9	Médio
Sobre peso	≥ 25	-
Pré-obeso	25,0 a 29,9	Aumentado
Obeso I	30,0 a 34,9	Moderado
Obeso II	35,0 a 39,9	Grave
Obeso III	≥ 40,0	Muito grave

(ABESO, 2009/2010)

Tabela 2 - Circunferência abdominal e risco de complicações metabólicas associadas com obesidade em homens e mulheres caucasianos<sup>27</sup>(A)

Circunferência abdominal (cm)			
Risco de complicações metabólicas	Homem	Mulher	Nível de ação
Aumentado	≥ 94	≥ 80	1
Aumentado substancialmente	≥ 102	≥ 88	2

"Nível de ação" significa a importância de se recomendar a redução da medida da circunferência abdominal quando 1 é menos importante do que 2.

(ABESO, 2009/2010)

Por englobar desde aspectos genéticos a condições psicológicas, a obesidade é uma doença de etiologia vasta e complexa, com fisiopatologia própria. Portanto, aceitar a obesidade como uma doença é fundamental para o seu tratamento.

Desse modo, existem estudos que propõem o tratamento interdisciplinar da obesidade, como proposta efetiva e essencial para mudanças no estilo de vida e combate à patologia em questão. Para tanto, a intervenção deve incluir orientação nutricional, psicológica e prática de exercício físico, com o objetivo de promover modificações na composição corporal, visando a menor deposição de tecido adiposo e a manutenção ou o aumento da massa magra do indivíduo, além de consequente melhora na saúde e na qualidade de vida (Bianchini et al., 2013; de Mello et al., 2011; Lofrano-Prado et al., 2009).

## 2 – Epidemiologia da obesidade

A prevalência da obesidade e seus agravantes aumentaram expressivamente nas últimas décadas, e tem se tornado um grave problema de saúde pública mundial. Atinge não só adultos, mas também crianças e jovens, tanto de países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Conde e Borges, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a obesidade no mundo praticamente dobrou desde 1980. Em 2008, mais de 1,4 bilhão de adultos estavam acima do peso. Destes, em torno de 500 milhões eram clinicamente obesos. Hoje, 65% da população mundial vive em países onde o excesso de peso e obesidade mata mais pessoas do que o baixo peso/inanição.

No começo dos anos noventa, a OMS iniciou estado de alerta, após uma estimativa de que 18 milhões de crianças em todo o mundo, menores de 5 anos, foram diagnosticadas com sobrepeso (Soares e Petroski, 2003). Dados atuais da OMS relatam que em 2011, mais de 40 milhões de crianças menores de cinco anos estavam acima do peso.

Estudos realizados no Brasil desde 1970 apresentam dados de aumento na prevalência do excesso de peso e a obesidade também aumentou, não apenas em adultos, mas também em crianças e adolescentes, sendo que recentemente prevalências mais elevadas têm sido observadas (Gigante, 2011). Em 2008, o excesso de peso atingia 33,5% das crianças de cinco a nove anos, sendo que 16,6% do total de meninos também eram obesos; entre as meninas, a obesidade apareceu em 11,8% (IBGE, 2010). Em adolescentes, entre 1975 e 1997, o excesso de peso passou de 4,1% para 13,9%, e estudo realizado em 2002-2003 identificou 12,3% de adolescentes com sobrepeso e 2,3% com obesidade (Pelegrini et al., 2008).

Segundo última pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) dos 10 aos 19 anos, o sobrepeso aumentou seis vezes para homens e três para mulheres em 34 anos. Entre meninos e rapazes 21,7% estão com excesso de peso, já entre as meninas e moças 19,4% apresentam excesso de peso. Quanto à obesidade, mostra-se menos intensa, mas também com tendência ascendente, indo de 0,4% para 5,9% no sexo masculino e de 0,7% para 4,0% no sexo feminino.

Dentre o aumento da prevalência da obesidade, os dados que mais chamam atenção, preocupam profissionais da saúde e o sistema de saúde, é a repercussão que o excesso de peso e a obesidade têm apresentado em crianças e adolescentes. As complicações e alterações metabólicas precoces oriundas do excesso de gordura corporal é um grave problema associado à obesidade na infância e na adolescência (Halpern et al., 2010; Ice et al., 2011), além das evidências de que uma criança obesa possui fortes chances de se tornar um adulto obeso (Pimenta e Palma, 2001).

O primeiro levantamento sobre os custos da obesidade no Brasil revelaram gastos de um bilhão e 100 milhões de reais a cada ano, com internações hospitalares, consultas médicas e remédios destinados ao tratamento do excesso de peso e das doenças ligadas a ele. O Sistema Único de Saúde (SUS) destina 600 milhões de reais para as internações relativas à obesidade (Enes e Slater, 2010). Se os gastos públicos já são altos, os dados atuais conduzem a gastos cada vez maiores quando o assunto é excesso de peso, obesidade e suas complicações (Carvalho et al., 2013). Assim, é provável que este problema de saúde pública torne-se ainda mais preocupante nos próximos anos (Gigante, 2011).

### **3 - Obesidade, dieta e transição nutricional**

Ocorreram mudanças significativas no modo de vida das famílias brasileiras nos últimos 25 anos e alterações nos hábitos alimentares são um dos principais parâmetros influenciados pelo desenvolvimento tecnológico que têm contribuído para mudanças no estado nutricional da população (Garcia, 2003; Tardido e Falcão, 2006). Como mudança desses hábitos destaca-se a crescente participação da mulher no mercado de trabalho, o que reduziu o tempo disponível para o cuidado com a alimentação da família, a implantação de indústrias multinacionais de alimentos, que ampliou a diversidade da oferta de alimentos industrializados (Garcia, 2003; Alves, 2003). Como consequência, a população aumentou o consumo de ácidos graxos saturados, açúcares, refrigerantes, álcool, produtos industrializados com excesso de ácidos graxos “trans”, carnes, leite e derivados ricos em gorduras, guloseimas como doces, chocolates, balas, etc. Por

outro lado, é observado redução considerável no consumo de carboidratos complexos, frutas, verduras e legumes; o que leva ao excesso de ingestão calórica pelo elevado consumo de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos), e deficiência de micronutrientes (vitaminas e minerais) (Escoda, 2002).

Assim como as alterações da característica da dieta, é observada acentuada redução do nível de atividade física na população. Diversos fatores podem explicar o fato, no entanto, os principais fatores se resumem ao aumento do número de trabalhos com redução do esforço físico ocupacional, em virtude do aumento da tecnologia, e as modificações nas atividades de lazer, que passam de atividades como práticas esportivas e longas caminhadas, para atividades sedentárias, como televisão, videogame ou computador (Souza, 2010). Estes fatores, somados, sedentarismo e alimentação de má qualidade, impulsionaram a transição nutricional (Garcia, 2003; Alves, 2003).

A transição nutricional é caracterizada pela redução dos índices de baixo peso e aumento de sobrepeso/obesidade. O termo é empregado para definir esse processo de alteração nos padrões alimentares e na condição nutricional da população, fortemente influenciados pela urbanização e *marketing* das indústrias de alimentos, que têm influencia direta na saúde, em virtude de sua associação com os altos índices de obesidade (Amuna and Zotor, 2008; Maire et al., 2002; Popkin, 2001).

A mudança no caráter nutricional também se relaciona com a mudança no perfil epidemiológico da população, com redução de casos por doenças infecciosas e crescente aumento de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT), que ganham destaque nas causas de óbitos (Amuna and Zotor, 2008; Pelegrini et al., 2008).

Dietas ricas em gordura levam à ingestão excessiva de energia e estão fortemente ligadas ao aumento da obesidade (Vaanholt et al., 2008), que é um fator de risco independente para o desenvolvimento de diabetes (Robiou-du-Pont et al., 2013). Além disso, dietas ricas em ácidos graxos saturados e trans aumentam os níveis de colesterol LDL e, por sua vez, o risco de doença cardíaca (Siri-Tarino et al., 2010). Existem, também, associações entre a gordura dietética total e câncer (ainda em debate) que demonstram evidências que relacionam alta ingestão de gordura com câncer de mama (Kim et al., 2014; Park et al., 2012),

próstata (Uehara et al., 2014) e cólon (Kim et al., 2014). O que deixa evidente os malefícios diretos e indiretos da ingestão excessiva de ácidos graxos.

Assim, recomendações alimentares surgiram ao longo dos últimos 40 anos para limitar o consumo de gordura total e gordura saturada, como uma maneira de reduzir o risco de uma série de doenças crônicas. No entanto, a maioria das pessoas, independentemente da idade, não relatam consumir uma dieta que atenda aos níveis de gordura e ácidos graxos saturados recomendados. Indivíduos que relatam consumir uma dieta com percentual menor ou igual à 30% da energia a partir de gordura têm ingestão de energia mais baixos. Dadas as crescentes taxas de obesidade em idade cada vez mais precoce, a redução de gordura na dieta pode ser uma parte efetiva de uma estratégia global para equilibrar o consumo de energia com necessidades energéticas (Lima et al., 2000).

#### **4 - Obesidade e exercício**

Entende-se por atividade física qualquer movimento corporal que eleve o gasto calórico acima do basal, sendo o exercício físico (um dos principais componentes da atividade física) uma atividade sistematizada, planejada, estruturada e repetitiva, que tem o objetivo específico de melhorar a saúde e a aptidão física (Medina, 2010).

A OMS estima que em todo o mundo, mais de 60% dos adultos não cumpram os níveis mínimos de atividade física que seriam benéficos para saúde. A inatividade física foi identificada como o 4º principal fator de risco para a mortalidade global. O sedentarismo está relacionado por cerca de 21 a 25% dos casos de câncer da mama e do cólon, 27% de diabetes e, aproximadamente, 30% das doenças isquêmicas do coração em todo o mundo. O risco de desenvolver uma doença cardiovascular aumenta até 1,5 vezes em pessoas que não cumprem as recomendações mínimas de atividade física (OMS, 2010).

Além das vantagens fisiopatológicas, o exercício, também proporciona benefícios psicológicos e sociais como melhora da autoestima e do convívio social, além de prevenir a depressão e o estresse (Teixeira, 2009).

Assim, o exercício físico tem sido largamente empregado no tratamento e prevenção da obesidade e das doenças associadas. Estudos com obesos submetidos a programas de treinamento evidenciam os benefícios do exercício, tanto aeróbico como resistido, em alguns parâmetros importantes para o controle da saúde e qualidade de vida. Os trabalhos apontam respostas significativas na melhoria das condições metabólicas, físicas e psicossociais, tais como:

- Diminuição do colesterol (redução de triglicérides, colesterol da fração LDL e aumento do colesterol na fração HDL) (Damaso et al., 2014; de Piano et al., 2012; Nascimento et al., 2014);
- Controle da glicemia, melhora na sensibilidade à insulina (Damaso et al., 2014; de Piano et al., 2012; Nascimento et al., 2014);
- Melhorias no condicionamento físico (Dominguez, 2002);
- Redução significativa na massa corporal, gordura visceral e subcutânea (de Mello et al., 2011; de Piano et al., 2012);
- Melhora na qualidade de vida (Lofrano-Prado et al., 2009);
- Minimização da ansiedade, depressão e compulsão alimentar (Lofrano-Prado et al., 2009).

Portanto, o exercício físico trata-se de uma importante ferramenta não farmacológica para o tratamento e prevenção da obesidade. Diversos estudos, (Petelin et al., 2014; Rinaldi et al., 2014; Trachta et al., 2014), assim como os acima citados, demonstram que a prática regular de exercício atua de forma positiva na redução do peso corporal e nos fatores de risco associados.

## 5 - Modelos experimentais de obesidade

A ciência busca compreender a importância de cada um dos elementos envolvidos em diversas doenças, e para tanto, muitas vezes é preciso utilizar modelos experimentais. Estes permitem a avaliação sistêmica e fisiopatológica além de permitir importantes descobertas em menor tempo, devido ao ciclo de vida reduzido dos animais utilizados.

Dentre os modelos genéticos de obesidade, podemos citar o camundongo com mutação para o gene da leptina ob/ob (Tartaglia et al., 1995; Akagiri et al., 2008; Almeida et al., 2011) ou para o receptor da leptina db/db, ambos

desenvolvem obesidade precoce, com crescimento linear diminuído e apresentam infertilidade (Tartaglia et al., 1995).

Além da mutação genética, dois modelos de dieta têm sido amplamente utilizados para indução de obesidade: dieta hiperlipídica (com adição de banha de porco – gordura saturada) (Oakes et al., 1997; Buettner, Scholmerich e Bollheimer, 2007; Thaler et al., 2012) e dieta de cafeteria (dieta hiperlipídica e hiperglicídica) (Bartolomucci et al., 2009). Tais modelos, promovem alterações metabólicas, como o aumento de tecido adiposo abdominal, esteatose hepática, alterações no perfil lipídico e insulínico, assim como as observadas na obesidade humana (Buettner, Scholmerich e Bollheimer, 2007; Bartolomucci et al., 2009).

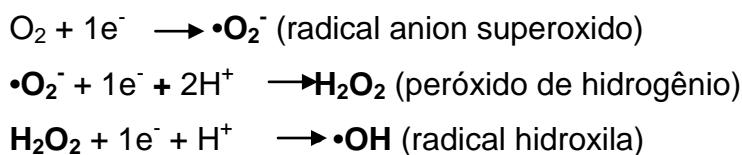
Os camundongos das linhagens isogênicas ou *inbred* (C57BL/6, C57BL/6J, AKR/J, A/J) são os animais utilizados com maior frequência em modelo de indução de obesidade, pois seu cruzamento permite a criação de populações estáveis e geneticamente homogêneas. No entanto, tal homogeneidade não condiz com a reprodução humana. Assim, a utilização de camundongos obtidos pelo cruzamento ao acaso (heterogêneos - Swiss), podem manter variabilidade genética mais próxima à encontrada na população humana e possuem menor custo de reprodução e manutenção, favorecendo sua utilização (White et al., 2013).

## 6 - Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante

Os radicais livres são moléculas que contêm um ou mais elétrons não emparelhados no orbital atômico ou molecular mais externo que, promovem reatividade destas moléculas (Echtay, 2007). Algumas substâncias possuem propriedade reativa, mas não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, assim, o termo radical livre não é o ideal para referenciar estes agentes reativos. O termo espécies reativas é o mais apropriado para tal (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Parte das espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas pela respiração mitocondrial (cadeia transportadora de elétrons), onde, em torno de 95% do oxigênio consumido é reduzido à água (Valko et al., 2004; Halliwell, 2006). No entanto, parte do O<sub>2</sub> consumido pode ser reduzido ao radical ânion

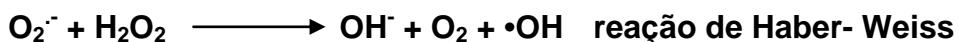
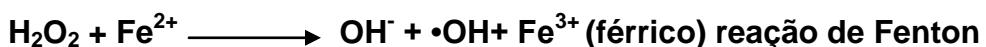
superoxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) e, subsequentemente, a outras espécies reativas de oxigênio (esquema abaixo), tais como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e o oxigênio singlet ( ${}^1\text{O}_2$ ) (Steinbrenner and Sies, 2009). Está não é a única forma de produção de ERO, estas também podem ocorrer em outras situações bioquímico-celulares, como em processos isquêmicos e inflamatórios (Halliwell, 2006).



Embora a produção de EROs seja normal e essencial para o funcionamento celular, o excesso de EROs pode acarretar em desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes e propiciar danos moleculares aos ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos, caracterizando o estresse oxidativo (Halliwell, 2006; Valko et al., 2006). O estresse oxidativo é atualmente associado com inúmeras doenças crônicas, tais como câncer, diabetes *mellitus*, obesidade, doenças cardiovasculares, desordens neurodegenerativas e também com o processo de envelhecimento (Rajendran et al., 2014; Reiter et al., 2002).

Dentre às principais formas de EROs, o  $\bullet\text{O}_2^-$  é o que possui menor capacidade oxidativa. Mesmo que pouco reativo, é uma espécie reativa de oxigênio primária, que pode reagir com outras moléculas, principalmente por meio de processos catalisados por enzimas ou metais, gerando espécies reativas de oxigênio secundárias (Halliwell e Gutteridge, 2007; Powers et al., 2011).

Diferentemente, o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) é a espécie reativa de oxigênio mais reativa do sistema biológico. Pode atingir e destruir membranas celulares, proteínas e causar mutações em ácidos nucleicos. É gerado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  através de reações catalisadas por metais, tais como a reação de Fenton (esquema abaixo). Em biologia celular, esta reação é importante como parte da reação de Haber-Weiss (esquema abaixo), em que o ferro (ou cobre) são mantidos em um estado reduzido por superóxido e, por conseguinte, catalisam a formação do radical hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio (Liochev e Fridovich, 2002; Hunter et al., 2002; Powers and Jackson, 2008; Powers et al., 2011).



Apesar de não ser um radical livre, uma vez que não apresenta elétrons desemparelhados na última camada, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é bastante tóxico e deletério, possui vida longa, é capaz de atravessar a membrana nuclear ocasionando danos na molécula de DNA ( Halliwell e Gutteridge, 2007). Os peroxissomos são um dos principais locais onde o consumo de oxigênio leva à produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; a presença de enzimas antioxidantes na organela mantém o equilíbrio em seu interior. Por isso, qualquer lesão nos peroxissomos promove o extravasamento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para o citosol, contribuindo para o aumento significativo do estresse oxidativo na célula (Valko et al., 2006).

A forma excitada do oxigênio molecular, o oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ), também não é um radical livre, por não possuir elétrons desemparelhados na camada de valência, no entanto, parece agir em alguns eventos biológicos. A dismutação do ânion de superóxido em água pode conduzir a sua formação (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Quanto às espécies reativas de nitrogênio, o óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) é um sinalizador molecular para uma série de processos fisiológicos, importante para neurotransmissão, regulação da pressão arterial, relaxamento da musculatura lisa e regulação do sistema imune. Possui vida média de apenas poucos segundos e é solúvel tanto no ambiente lipídico quanto no aquoso. Quando reage com o oxigênio e água, libera ânions nitrito e nitrato. Já sua reação com o  $\cdot\text{O}_2^-$  promove a liberação de um importante agente oxidante, peróxido nitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que pode causar fragmentação de DNA e oxidação lipídica (Reiter et al., 2002).

Para evitar maiores danos moleculares pelas espécies reativas, o organismo humano possui mecanismos de defesa que consistem de sistemas e substâncias conhecidas como antioxidantes. Termo empregado para substâncias que são capazes de inibir ações de oxidação através da sua própria oxidação, antioxidantes são frequentemente agentes de redução que retardam ou previnem significativamente a oxidação de substratos. Os antioxidantes podem ser

enzimáticos (endógenos) e não enzimáticos (exógenos) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Reiter et al., 2002).

As principais enzimas que fazem parte da defesa antioxidante são: superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Enquanto as não-enzimáticas são representadas principalmente pelo(a) ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico, tocoferol (vitamina E), glutationa reduzida (GSH), carotenóides (vitamina A) e flavonóides (Angelopoulou et al., 2009; Blokhina et al., 2003; Valko et al., 2007).

A SOD é responsável por catalisar a conversão de  $\cdot\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Possui duas isoformas: cobre-zinco (CuZn-SOD) e a manganês (Mn-SOD), presente no citosol, lisossomas, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria e localizada apenas na mitocôndria. A CAT por sua vez, catalisa a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em oxigênio e água e encontra-se nos peroxissomas e também nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (Blokhina et al., 2003). A GPx atua sobre peróxidos em geral e apresenta cinco isoformas: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 e GPx5 que têm localização (tecidos) e ação (substrato que catalisam) diferentes (Brigelius-Flohe, 2006). As principais características dessa família de enzimas é a presença de um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima e o fato de utilizar a glutationa reduzida (GSH) como doador de elétrons para a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outros peróxidos orgânicos (Meister e Anderson., 1983).

A GSH é um tripeptídeo considerado o principal composto antioxidante intracelular e possui diversas funções. Primeiro, GSH pode reagir diretamente com várias EROs doando um átomo de hidrogênio. Além disso, como discutido anteriormente, é fundamental para a GPx atuar e participa, na redução de outros antioxidantes na célula (por exemplo, vitaminas E e C) (Powers et al., 2011). Assim, além da GSH, como mencionado anteriormente, vitaminas advindas da alimentação compõem o quadro de substâncias não-enzimáticas importantes na defesa antioxidante.

## 6.1 – Estresse oxidativo e exercício

Durante o exercício físico, várias reações químicas e enzimáticas implicam em aumento fisiológico da formação de EROs e se sabe que a produção

desproporcional de EROs pode levar o organismo ao estresse oxidativo (Pinho et al., 2006; Silva et al., 2009). Durante a realização de um treino de corrida, por exemplo, existe um alto consumo de oxigênio, que se eleva de 10-20 vezes a níveis sistêmicos (Astrand et al., 1986; Silva et al., 2009) e 100-200 vezes a nível músculo esquelético (Silva et al., 2009), resultando em substancial aumento no fluxo de elétrons mitocondrial. Sendo assim, exercícios físicos extenuantes, podem acarretar na produção exacerbada de EROs e, consequentemente, provocar danos oxidativos (Pinho et al., 2006; Silva et al., 2009).

No entanto, os efeitos do exercício físico sobre a cadeia respiratória mitocondrial e dano oxidativo está associado ao tipo, frequência, intensidade e duração do exercício (Gomez-Cabrera et al., 2009; Pinho et al., 2006). Apesar do exercício intenso alterar o equilíbrio entre oxidantes / antioxidantes, exercícios moderados e regulares proporcionam biogênese mitocondrial com significante aumento do número de mitocôndrias musculares (Leeuwenburgh e Heinecke, 2001; Radak et al., 2005). Aparentemente, estímulos contínuos, como baixas concentrações de EROs pelo exercício, levam à indução do aumento da expressão de enzimas antioxidantes o que contribui para diminuir o estresse oxidativo (Gomez-Cabrera et al., 2009; Leeuwenburgh and Heinecke, 2001; Radak et al., 2005; Silva et al., 2009). Contudo, o tempo e intensidade de exercício físico, necessários para indução das adaptações mitocondriais e enzimáticas, com consequente redução no dano oxidativo, ainda não são claros (Silva et al., 2009).

## 6.2 – Estresse oxidativo e obesidade

Ao comparar indivíduos eutróficos e obesos, os níveis de EROs apresentam-se mais elevados na população obesa (Dandona et al., 2001; Vincent and Taylor, 2006), no entanto, não está claro se a obesidade em si leva ao estresse oxidativo (Van Gaal et al., 2006). Alguns fatores característicos de pacientes obesos como a hipercolesterolemia, o metabolismo anormal no tecido adiposo ou a excessiva liberação de citocinas inflamatórias podem estar associados a níveis de marcadores oxidantes mais elevados nessa população. Sendo assim, o estresse oxidativo na obesidade possivelmente ocorre pelo

aumento de EROs oriundas dos fatores a pouco mencionados e a uma aparente redução dos mecanismos de defesa antioxidante (Keaney et al., 2003). Além disso, a obesidade também está associada com a produção de superóxido a partir de elevada infiltração / atividade de macrófagos e a atividade da NADPH-oxidase associada com inflamação crônica (Liu et al., 2013).

O sistema de defesa antioxidante celular é normalmente suficiente para reduzir, remover e reparar o estresse/dano oxidativo. No entanto, o aumento da produção de pró-oxidantes pode sobrecarregar o sistema e promover o estresse oxidativo crônico. Há também evidências de que a obesidade está associada à redução da expressão de várias proteínas antioxidantes (Liu et al., 2013). Estudos *in vivo*, com aumento da expressão de SOD, mostraram reduzir o estresse oxidativo em camundongos (Chen et al., 2003; Jang et al., 2009). Assim, pode-se prever que o aumento de antioxidantes reduziria EROs, dano oxidativo e preveniria prejuízos metabólicos associados à obesidade.

De maneira geral, os estudos sugerem que o quadro de estresse oxidativo encontrado na obesidade pode contribuir para a evolução de outras doenças como a aterosclerose, diabetes mellitus e hipertensão arterial (Ozata et al., 2002). Assim, estudos têm sugerido diversas formas de minimizar tais efeitos, sendo a alimentação e a prática de exercícios físicos os principais contribuintes nesse controle (Antoniades et al., 2003).

## **7 - Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)**

Além de um dos mais graves problemas de saúde pública do século 21, o aumento da prevalência da obesidade, é responsável diretamente pelo crescente aparecimento da esteatose hepática não alcoólica que, por sua vez, vêm emergindo como uma pandemia (Zambo et al., 2013).

A obesidade está associada com o aumento da concentração de ácidos graxos livres circulantes que constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de esteatose hepática. Assim, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), caracterizada por esteatose hepática e esteato-hepatite não-alcoólica inflamatória é atualmente a doença de fígado mais comum no mundo, afetando adultos e crianças (Xin et al., 2014).

Embora não tenha sido totalmente esclarecida a patogênese da doença, o aumento da retenção de lipídios nos hepatócitos, principalmente sob a forma de triglicérides, é uma característica inicial comum. Tal efeito geralmente leva ao desenvolvimento de esteatose e, posteriormente, de esteato-hepatite, caracterizada por infiltração dos neutrófilos e macrófagos. Aparentemente, em estágios iniciais, a esteatose hepática não alcoólica parece aumentar a vulnerabilidade do fígado para oxidantes sem desenvolver lesão oxidativa, enquanto, a esteato-hepatite está comumente associada ao estresse oxidativo (Demori et al., 2006).

A DHGNA parece envolver dois processos relacionados ao aparecimento e agravo da condição hepática. O primeiro é a esteatose, que se acredita ser desencadeada por resistência à insulina, e o segundo envolve resultados de estresse oxidativo que contribuem para a progressão da doença. Além disso, as citocinas pró-inflamatórias têm sido implicadas na patogênese da DHGNA, além de contribuir para o aumento do risco de carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2014). Portanto, é esperado que a atenuação do acúmulo de lipídios, do dano oxidativo e da inflamação associada à obesidade possa exercer efeitos benéficos e, assim, ser uma estratégia terapêutica potencial para a DHGNA (Wang et al., 2014).

## 8 - Referências

ABESO - Diretrizes Brasileiras de Obesidade. Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica: São Paulo, 2009.

Akagiri, S., Y. Naito, H. Ichikawa, K. Mizushima, T. Takagi, O. Handa, S. Kokura, and T. Yoshikawa, 2008, A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice: J Clin Biochem Nutr, v. 42, p. 150-7.

Almeida, W. S., L. C. Lima, V. N. Cunha, R. C. R, R. C. Araujo, C. C. Barros, H. G. Simoes, and C. S. Campbell, 2011, Assessment of aerobic capacity during swimming exercise in ob/ob mice: Cell Biochem Funct, v. 29, p. 666-72.

Amuna, P., and F. B. Zotor, 2008, Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development: Proc Nutr Soc, v. 67, p. 82-90.

Angelopoulou, R., G. Lavranos, and P. Manolakou, 2009, ROS in the aging male: model diseases with ROS-related pathophysiology: *Reprod Toxicol*, v. 28, p. 167-71.

Antoniades, C., D. Tousoulis, C. Tentolouris, P. Toutouzas, and C. Stefanadis, 2003, Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice: *Herz*, v. 28, p. 628-38.

Astrand, P. O., E. Hultman, A. Juhlin-Dannfelt, and G. Reynolds, 1986, Disposal of lactate during and after strenuous exercise in humans: *J Appl Physiol* (1985), v. 61, p. 338-43.

Bartolomucci, A., A. Cabassi, P. Govoni, G. Ceresini, C. Cero, D. Berra, H. Dadomo, P. Franceschini, G. Dell'omo, S. Parmigiani, and P. Palanza, 2009, Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress: *PLoS One*, v. 4, p. e4331.

Bianchini, J. A., D. F. da Silva, C. C. Nardo, I. D. Carolino, F. Hernandes, and N. Nardo, Jr., 2013, Multidisciplinary therapy reduces risk factors for metabolic syndrome in obese adolescents: *Eur J Pediatr*, v. 172, p. 215-21.

Blokhina, O., E. Virolainen, and K. V. Fagerstedt, 2003, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review: *Ann Bot*, v. 91 Spec No, p. 179-94.

Brigelius-Flohe, R., 2006, Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors: *Biol Chem*, v. 387, p. 1329-35.

Buettner, R., Scholmerich, J., Bollheimer, C., 2007, High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents: *Obesity*, v. 15, p. 798-808.

Carvalho, E.A.A, et al., 2013, Obesidade: aspectos epidemiológicos e prevenção: *Rev Med Minas Gerais*, v. 23, p. 74-82.

Chen, X., J. Mele, H. Giese, H. Van Remmen, M. E. Dolle, M. Steinhelper, A. Richardson, and J. Vijg, 2003, A strategy for the ubiquitous overexpression of human catalase and CuZn superoxide dismutase genes in transgenic mice: *Mech Ageing Dev*, v. 124, p. 219-27.

Conde, W.L; Borges, C; 2011, O risco de incidência e persistência da obesidade entre adultos brasileiros segundo seu estado nutricional ao final da adolescência: *Rev Bras Epidemiol*, v. 14, p.71-9.

Dandona, P., P. Mohanty, H. Ghanim, A. Aljada, R. Browne, W. Hamouda, A. Prabhala, A. Afzal, and R. Garg, 2001, The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, p. 355-62.

Damaso, A. R. Obesidade. 2ed. Guanabara Koogan, 2009

Damaso, A. R; et.al; 2006, Tratamento multidisciplinar reduz o tecido adiposo visceral, leptina, grelina e a prevalência de esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) em adolescentes obesos: Rev Bras Med Esporte, v. 12.

Damaso, A. R., R. M. Campos, D. A. Caranti, A. de Piano, M. Fisberg, D. Foschini, P. D. Sanches, L. Tock, H. M. Lederman, S. Tufik, and M. T. de Mello, 2014, Aerobic plus resistance training was more effective in improving the visceral adiposity, metabolic profile and inflammatory markers than aerobic training in obese adolescents: J Sports Sci, p. 1-11.

de Mello, M. T., A. de Piano, J. Carnier, L. Sanches Pde, F. A. Correa, L. Tock, R. M. Ernandes, S. Tufik, and A. R. Damaso, 2011, Long-term effects of aerobic plus resistance training on the metabolic syndrome and adiponectinemia in obese adolescents: J Clin Hypertens (Greenwich), v. 13, p. 343-50.

de Piano, A., M. T. de Mello, L. Sanches Pde, P. L. da Silva, R. M. Campos, J. Carnier, F. Corgosinho, D. Foschini, D. L. Masquio, L. Tock, L. M. Oyama, C. M. do Nascimento, S. Tufik, and A. R. Damaso, 2012, Long-term effects of aerobic plus resistance training on the adipokines and neuropeptides in nonalcoholic fatty liver disease obese adolescents: Eur J Gastroenterol Hepatol, v. 24, p. 1313-24.

Dominguez, L. C. G, 2002; Efectos del ejercicio aeróbico submáximo em pacientes com sobrepeso y/o obesidad y diabetes mellitus tipo 2: Calimed, v. 8(1).

de Mello, M. T., A. de Piano, J. Carnier, L. Sanches Pde, F. A. Correa, L. Tock, R. M. Ernandes, S. Tufik, and A. R. Damaso, 2011, Long-term effects of aerobic plus resistance training on the metabolic syndrome and adiponectinemia in obese adolescents: J Clin Hypertens (Greenwich), v. 13, p. 343-50.

Demori, I., A. Voci, E. Fugassa, and B. Burlando, 2006, Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver: Alcohol, v. 40, p. 185-91.

Echtay, K. S., 2007, Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?: Free Radic Biol Med, v. 43, p. 1351-71.

Enes, C.C. Slater, B, 2010, Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes: Rev Bras Epidemiol, v. 13, p. 163-71.

Escoda, M.S.Q, 2002, Para a crítica da transição nutricional: Ciência e Saúde Coletiva, v. 7, p. 219-226.

Garcia,R.W.D, 2003, Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana: Revista de Nutrição, v. 16, p. 483-92.

Gigante, D.P; et.al., 2011, Variação temporal na prevalência do excesso de peso e obesidade em adultos: Brasil, 2006 a 2009: Rev Bras Epidemiol, v. 14, p. 157-65.

Gomez-Cabrera, M. C., J. Vina, and L. L. Ji, 2009, Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: implications for muscle health: *Phys Sportsmed*, v. 37, p. 116-23.

Greenway, F. L., and S. R. Smith, 2000, The future of obesity research: *Nutrition*, v. 16, p. 976-82.

Halliwell, B., 2006, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life: *Plant Physiol*, v. 141, p. 312-22.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. Free radicals in biology and medicine. Oxford Press; Oxford: 2007.p. 936.

Halpern, A., M. C. Mancini, M. E. Magalhaes, M. Fisberg, R. Radominski, M. C. Bertolami, A. Bertolami, M. E. de Melo, M. T. Zanella, M. S. Queiroz, and M. Nery, 2010, Metabolic syndrome, dyslipidemia, hypertension and type 2 diabetes in youth: from diagnosis to treatment: *Diabetol Metab Syndr*, v. 2, p. 55.

Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA, Kandarian SC, 2002, Activation of an alternative NF- $\kappa$ B pathway in skeletal muscle during disuse atrophy: *FASEB J.* , v.16, p.529–538.

Ice, C. L., E. Murphy, L. Cottrell, and W. A. Neal, 2011, Morbidly obese diagnosis as an indicator of cardiovascular disease risk in children: results from the CARDIAC Project: *Int J Pediatr Obes*, v. 6, p. 113-9.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – Antropometria e análise do estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil, 2010.

Jang, Y. C., V. I. Perez, W. Song, M. S. Lustgarten, A. B. Salmon, J. Mele, W. Qi, Y. Liu, H. Liang, A. Chaudhuri, Y. Ikeno, C. J. Epstein, H. Van Remmen, and A. Richardson, 2009, Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice: *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 64, p. 1114-25.

Keaney, J. F., Jr., M. G. Larson, R. S. Vasan, P. W. Wilson, I. Lipinska, D. Corey, J. M. Massaro, P. Sutherland, J. A. Vita, and E. J. Benjamin, 2003, Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, p. 434-9.

Kim, M., H. J. Cho, G. T. Kwon, Y. H. Kang, S. H. Kwon, S. Her, T. Park, Y. Kim, Y. Kee, and J. H. Park, 2014, Benzyl isothiocyanate suppresses high-fat diet-stimulated mammary tumor progression via the alteration of tumor microenvironments in obesity-resistant BALB/c mice: *Mol Carcinog*.

Leeuwenburgh, C., and J. W. Heinecke, 2001, Oxidative stress and antioxidants in exercise: *Curr Med Chem*, v. 8, p. 829-38.

Lima, F.E.L, Menezes, T.N; Tavares, N.P; Szarfarc, S.C; Fisberg, R.M, 2000, Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão: Rev. Nutr., v. 13, p. 73-80.

Liochev, S. I., Fridovich, I., 2002, The Haber–Weiss cycle—70 years later: An alternative view; Redox Rep., v. 7, p. 55–57.

Liu, Y., W. Qi, A. Richardson, H. Van Remmen, Y. Ikeno, and A. B. Salmon, 2013, Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase: Biochem Biophys Res Commun, v. 438, p. 78-83.

Lofrano-Prado, M. C., H. K. Antunes, W. L. do Prado, A. de Piano, D. A. Caranti, L. Tock, J. Carnier, S. Tufik, M. T. de Mello, and A. R. Damaso, 2009, Quality of life in Brazilian obese adolescents: effects of a long-term multidisciplinary lifestyle therapy: Health Qual Life Outcomes, v. 7, p. 61.

Maire, B., S. Lioret, A. Gartner, and F. Delpeuch, 2002, [Nutritional transition and non-communicable diet-related chronic diseases in developing countries]: Sante, v. 12, p. 45-55.

Marti, A., A. Marcos, and J. A. Martinez, 2001, Obesity and immune function relationships: Obes Rev, v. 2, p. 131-40.

Medina, F.L; et.al., 2010, Atividade física: impacto sobre a pressão arterial: Rev Bras Hipertens, v. 17, p.103-106.

Meister A, Anderson ME., 1983, Glutathione. Annu Rev Biochem., v.52, p.711–760.

Nascimento, H., E. Costa, S. Rocha, C. Lucena, P. Rocha-Pereira, C. Rego, H. F. Mansilha, A. Quintanilha, L. Aires, J. Mota, A. Santos-Silva, and L. Belo, 2014, Adiponectin and markers of metabolic syndrome in obese children and adolescents: impact of 8-mo regular physical exercise program: Pediatr Res, v. 76, p. 159-65.

Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW., 1997, Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding: Diabetes, v. 46, p. 1768 –74.

Ozata, M., M. Mergen, C. Oktenli, A. Aydin, S. Y. Sanisoglu, E. Bolu, M. I. Yilmaz, A. Sayal, A. Isimer, and I. C. Ozdemir, 2002, Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity: Clin Biochem, v. 35, p. 627-31.

Park, H., M. Kim, G. T. Kwon, Y. Lim do, R. Yu, M. K. Sung, K. W. Lee, J. W. Daily, 3rd, and J. H. Park, 2012, A high-fat diet increases angiogenesis, solid tumor growth, and lung metastasis of CT26 colon cancer cells in obesity-resistant BALB/c mice: Mol Carcinog, v. 51, p. 869-80.

Pelegrini, A., E. L. Petroski, S. Coqueiro Rda, and A. C. Gaya, 2008, Overweight and obesity in Brazilian schoolchildren aged 10 to 15 years: data from a Brazilian sports project: *Arch Latinoam Nutr*, v. 58, p. 343-9.

Petelin, A., M. Bizjak, M. Cernelic-Bizjak, M. Jurdana, T. Jakus, and Z. Jenko-Praznikar, 2014, Low-grade inflammation in overweight and obese adults is affected by weight loss program: *J Endocrinol Invest*.

Pimenta, A.P.A.A; Palma, A, 2001, Perfil epidemiológico da obesidade em crianças: relação entre televisão, atividade física e obesidade: *Rev. Bras. Ciênc. e Mov.*, v.9, p.19-24.

Pinho, R. A., M. E. Andrade, M. R. Oliveira, A. C. Pirola, M. S. Zago, P. C. Silveira, F. Dal-Pizzol, and J. C. Moreira, 2006, Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise: *Cell Biol Int*, v. 30, p. 848-53.

Popkin, B. M., 2001, Nutrition in transition: the changing global nutrition challenge: *Asia Pac J Clin Nutr*, v. 10 Suppl, p. S13-8.

Powers, S. K., and M. J. Jackson, 2008, Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production: *Physiol Rev*, v. 88, p. 1243-76.

Powers, S. K., L. L. Ji, A. N. Kavazis, and M. J. Jackson, 2011, Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle: *Compr Physiol*, v. 1, p. 941-69.

Radak, Z., H. Y. Chung, and S. Goto, 2005, Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging: *Biogerontology*, v. 6, p. 71-5.

Rajendran, P., N. Nandakumar, T. Rengarajan, R. Palaniswami, E. N. Gnanadhas, U. Lakshminarasaiah, J. Gopas, and I. Nishigaki, 2014, Antioxidants and Human Diseases: *Clin Chim Acta*.

Reiter, R. J., D. X. Tan, and S. Burkhardt, 2002, Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin: *Mech Ageing Dev*, v. 123, p. 1007-19.

Rezende, F.A.C; *et.al.*, 2010, Aplicabilidade do Índice de Massa Corporal na Avaliação da Gordura Corporal: *Rev Bras Med Esporte*, v. 16, p. 90-94.

Rinaldi, W., R. M. Gomes, D. X. Scomparin, S. Grassioli, T. A. Ribeiro, G. S. Fabricio, L. F. Barella, A. Pavanello, A. B. Trombini, P. C. Mathias, and J. C. de Oliveira, 2014, Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats: *J Int Soc Sports Nutr*, v. 11, p. 25.

Robiou-du-Pont, S., A. Bonnefond, L. Yengo, E. Vaillant, S. Lobbens, E. Durand, J. Weill, O. Lantieri, B. Balkau, G. Charpentier, M. Marre, P. Froguel, and D.

Meyre, 2013, Contribution of 24 obesity-associated genetic variants to insulin resistance, pancreatic beta-cell function and type 2 diabetes risk in the French population: *Int J Obes (Lond)*, v. 37, p. 980-5.

Rosini, T.C; Silva, A.S.R; Moraes, C, 2012, Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade: *Rev Assoc Med Bras*, v.58, p.383-387.

Silva, L. A., C. A. Pinho, K. S. Scarabelot, D. B. Fraga, A. M. Volpato, C. R. Boeck, C. T. De Souza, E. L. Streck, and R. A. Pinho, 2009, Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle: *Eur J Appl Physiol*, v. 105, p. 861-7.

Siri-Tarino, P. W., Q. Sun, F. B. Hu, and R. M. Krauss, 2010, Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease: *Am J Clin Nutr*, v. 91, p. 502-9.

Soares,L.D; Petroski,E.L, 2003, Prevalência, fatores etiológicos e tratamento da obesidade infantil: *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano*, v. 5, p.63-74.

Souza, E.B, 2010, Transição nutricional no Brasil: análise dos principais fatores: *Cadernos UniFOA*, v.13, p. 49-53.

Steinbrenner, H., and H. Sies, 2009, Protection against reactive oxygen species by selenoproteins: *Biochim Biophys Acta*, v. 1790, p. 1478-85.

Tardido, A.P; Falcão,M.C, 2006, O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade: *Rev Bras Nutr Clin*, v.21, p.117-24.

Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X.,Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., et al, 1995, Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R: *Cell*, Vol. 83, 1263-1271.

Teixeira, P.C; et.al., 2009, A prática de exercícios físicos em pacientes com transtornos alimentares: *Rev Psiq Clín.*, v.36, p.145-52

Thaler, J. P., C. X. Yi, E. A. Schur, S. J. Guyenet, B. H. Hwang, M. O. Dietrich, X. Zhao, D. A. Sarruf, V. Izgur, K. R. Maravilla, H. T. Nguyen, J. D. Fischer, M. E. Matsen, B. E. Wisse, G. J. Morton, T. L. Horvath, D. G. Baskin, M. H. Tschoop, and M. W. Schwartz, 2012, Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans: *J Clin Invest*, v. 122, p. 153-62.

Trachta, P., J. Drapalova, P. Kavalkova, V. Touskova, A. Cinkajzlova, Z. Lacinova, M. Matoulek, T. Zelinka, J. Widimsky, Jr., M. Mraz, and M. Haluzik, 2014, Three months of regular aerobic exercise in patients with obesity improve systemic subclinical inflammation without major influence on blood pressure and endocrine production of subcutaneous fat: *Physiol Res*, v. 63 Suppl 2, p. S299-308.

Uehara, H., T. Takahashi, M. Oha, H. Ogawa, and K. Izumi, 2014, Exogenous fatty acid binding protein 4 promotes human prostate cancer cell progression: *Int J Cancer*.

Vaanholt, L. M., I. Jonas, M. Doornbos, K. A. Schubert, C. Nyakas, T. Garland, Jr., G. H. Visser, and G. van Dijk, 2008, Metabolic and behavioral responses to high-fat feeding in mice selectively bred for high wheel-running activity: *Int J Obes (Lond)*, v. 32, p. 1566-75.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., e Telser, J., 2004, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence: *Mol. Cell. Biochem*, v. 266, p. 37-56.

Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer: *Chem Biol Interact*, v. 160, p. 1-40.

Valko, M., Leibfritz, P., Moncol, M., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease: *The International Journal of Biochemistry e Cell Biology*, v. 39, p. 44-84.

Van Gaal, L. F., I. L. Mertens, and C. E. De Block, 2006, Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease: *Nature*, v. 444, p. 875-80.

Vincent, H. K., and A. G. Taylor, 2006, Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans: *Int J Obes (Lond)*, v. 30, p. 400-18.

Wang, J., C. Zhang, Z. Zhang, Q. Chen, X. Lu, M. Shao, L. Chen, H. Yang, F. Zhang, P. Cheng, Y. Tan, K. S. Kim, K. H. Kim, B. Wang, and Y. H. Kim, 2014, BL153 partially prevents high-fat diet induced liver damage probably via inhibition of lipid accumulation, inflammation, and oxidative stress: *Oxid Med Cell Longev*, v. 2014, p. 674690.

White, P.A.S, et al., 2013, Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose: *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v.57, p.339-345.

World Health Organization: Global Recommendations on Physical Activity for Health: WHO 2012.

Xin, J., D. Zeng, H. Wang, X. Ni, D. Yi, K. Pan, and B. Jing, 2014, Preventing non-alcoholic fatty liver disease through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by attenuating inflammation and mitochondrial injury and improving gut environment in obese mice: *Appl Microbiol Biotechnol*.

Zambo, V., L. Simon-Szabo, P. Szelenyi, E. Kereszturi, G. Banhegyi, and M. Csala, 2013, Lipotoxicity in the liver: *World J Hepatol*, v. 5, p. 550-557.

# **CAPÍTULO 2**

## **Efeito de diferentes intensidades de treinamento em modelo de obesidade experimental**

(Formatado segundo as normas da revista *European Journal of Applied Physiology*)

Zulmária R. R. de Freitas<sup>a</sup>, Pedro Augusto Silva Nogueira<sup>b</sup>, Leandro Cezar Domingos Galdino<sup>a</sup>, Wener Barbosa Resende<sup>a</sup>, Renata Graciele Zanon<sup>b</sup>, Françoise Vasconcelos Botelho<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Genética e Bioquímica; <sup>b</sup>Instituto de Ciências Biomédicas-Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brasil

**\*Endereço para correspondência:** Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho Tel.: +3432182203 Fax: +55 34 3218 2203#24, Endereço do laboratório: Avenida Pará, 1720CEP: 38400-902 – Uberlândia, MG, Brasil. E-mail: [ffrancoisevb@gmail.com](mailto:ffrancoisevb@gmail.com)

## RESUMO

O fígado é um dos órgãos do corpo mais afetados pela obesidade, relacionado diretamente com a doença hepática gordurosa não alcoólica, na qual, a retenção de lipídios nos hepatócitos aumenta a vulnerabilidade do fígado para oxidantes, contribuindo para o estresse oxidativo. Este trabalho avaliou o efeito de diferentes intensidades de exercício no perfil lipídico/morfológico hepático, estresse oxidativo hepático e muscular de camundongos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica. Os animais foram separados em dois grupos experimentais; grupo controle: dieta padrão (DP) e grupo obesos: dieta hiperlipídica (DH). Após 8 semanas de dieta os animais foram divididos em 3 sub-grupos: sem exercício (SEX), exercício sem carga (EXB) e exercício de moderada intensidade (EXM). O exercício realizado foi a natação, por 7 semanas experimentais, após uma semana de adaptação e teste de carga progressiva para determinação da carga de treino. Analisamos o perfil lipídico hepático (lipídeos totais, colesterol, triglicerídeos e análise morfológica) e morfometria do tecido adiposo. No fígado e músculo avaliamos a peroxidação lipídica (TBARS); proteína carbonilada; atividade de catalase e atividade antioxidante total (FRAP). O exercício de intensidade moderada foi capaz de atenuar a esteatose hepática no grupo com dieta hiperlipídica, reduzindo o conteúdo lipídico total deste tecido. O treinamento de moderada intensidade aumentou a peroxidação lipídica hepática no grupo que ingeriu dieta hiperlipídica. O conteúdo da dieta parece ser importante na peroxidação lipídica muscular, uma vez que encontramos diferença entre SEX-DP e SEX-DH. O exercício de moderada intensidade foi importante na redução da esteatose hepática, mas não foi eficiente na redução de massa corporal e tecido adiposo, assim como não reduziu danos oxidativos hepáticos e musculares.

**Palavras-chave:** obesidade, exercício, estresse oxidativo

## ABSTRACT

The liver is one of the organs of the body most affected by obesity, directly related to nonalcoholic fatty liver disease, in which the retention of lipids in hepatocytes increases the oxidation in the liver, contributing to oxidative stress. This study evaluated the effect of different exercise intensities on lipid profile / hepatic morphological, hepatic oxidative stress and muscle oxidative stress of mice induced obesity by fat diet. The animals were separated into two groups; control group: standard diet (SD) and obese group: fat diet (FD). After 8 weeks of diet, the animals were divided into three sub-groups: no exercise (NEX), exercise without load (EXB) and moderate intensity exercise (EXM). The swimming exercise was performed for 7 weeks trial, after a week of adaptation and progressive load test for determining the training load. We analyzed the hepatic lipid profile (total lipids, cholesterol, triglycerides and morphological analysis) and morphology of adipose tissue. In the liver and muscle were evaluated lipid peroxidation (TBARS); carbonyl protein; catalase activity and total antioxidant activity (FRAP). The exercise of moderate intensity was capable of attenuating hepatic steatosis in the group with high fat diet, reducing the total lipid content of this tissue. The moderate intensity training increased hepatic lipid peroxidation in the group that ingested fat diet. The diet of the content seems to be important in muscle lipid peroxidation, once we found difference between NEX-DP and NEX-DH. Moderate intensity exercise was important in the reduction of fatty liver, but was not effective in reducing body mass and fat mass, and not reduced hepatic and muscle oxidative damage.

**Keywords:** obesity, exercise, oxidative stress.

## 1 - Introdução

A obesidade é um problema de saúde em todo o mundo, ao qual, a ingestão de dietas hipercalóricas e o estilo de vida sedentário, podem ser destacados por serem os principais fatores responsáveis pelo drástico aumento da incidência de obesidade nos últimos anos (Hill et al., 2003; Nestel et al., 2007; Watanabe, Hojo e Nagahara, 2007; Selassie e Sinha, 2011). A obesidade representa não só uma preocupação de saúde pública devido à sua repercussão nos gastos públicos (Carvalho et.al, 2013; Enes e Slater, 2010; Akagiri et al., 2008), mas também leva a complicações graves, como doença cardiovascular, diabetes e câncer (Poirier, 2008; Lin et al., 2011; Wang et al., 2014). O fígado é um dos órgãos do corpo mais afetados pela obesidade, o que leva a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Farrell e Larter, 2006). DHGNA é uma condição patológica, que inclui aspectos de danos no fígado que vão desde a simples esteatose à esteato-hepatite, fibrose avançada, e progressão para cirrose (Adams et al., 2005).

A patogênese da DHGNA parece envolver dois processos (Dowman, Tomlinson e Newsome, 2010; Day e James, 1998). O primeiro é a esteatose que se acredita ser provocada por resistência à insulina e o segundo envolve estresse oxidativo resultando na progressão da doença (Wang et al., 2014). A dieta rica em ácidos graxos saturados está associada com o aumento do nível de ácidos graxos livres circulantes que constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de esteatose hepática (Xin et al., 2014) e a retenção de lipídios nos hepatócitos, principalmente sob a forma de triglicérides, aumentam a vulnerabilidade do fígado para oxidantes (Demori et al., 2006), contribuindo para o estresse oxidativo. Além disso, o aumento de citocinas pró-inflamatórias tem sido implicado na patogênese de esteatose hepática e na contribuição para o aumento do risco de carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2014). Por conseguinte, a atenuação da acumulação de lipídios, danos oxidativos, e a inflamação associada com a obesidade é esperado exercer efeitos benéficos e, assim, ser uma nova estratégia terapêutica potencial para a doença.

O exercício físico tem sido associado à melhora do sistema de defesa antioxidante e diminuição no dano oxidativo em diferentes tecidos em condições

patológicas diversas (Tuon et al., 2010; Menegali et al., 2009; Coelho et al., 2010; Frederico et al., 2009; Sakurai et al., 2009), bem como é destacado como importante fator na redução da obesidade (Buettner et al., 2007; Gomez-Cabrera et al., 2008). No entanto, ainda é preciso elucidar qual a intensidade ideal do exercício na obesidade para reduzir gordura corporal e para tratar as complicações, como a esteatose hepática, oriundas da obesidade.

Estudos mostram que os efeitos benéficos do exercício na DHGNA, em parte, acontecem por mecanismos metabólicos, como mudanças cardiorrespiratórias e no metabolismo oxidativo (Van der et al., 2009). Camundongos em treinamento, alimentados com dieta hiperlipídica, apresentaram redução na expressão de enzimas lipogênicas e aumento na fosforilação de acetil-CoA carboxilase (Cintra et al., 2012), o que resultou na reversão da esteatose, enquanto o treinamento com ratos obteve redução na glicemia, insulina, triglicerídeos e ácidos graxos livres, quando comparado ao grupo sedentário, apresentando redução da esteatose hepática (Rector et al., 2008).

Além disso, o exercício estimula a captação e oxidação de ácidos graxos pelo músculo (Van der et al., 2009) o que permite reduzir o acúmulo de lipídeos pelo fígado (Bonen et al., 2004). Considerando a importância do músculo esquelético no metabolismo, principalmente em exercício, no qual o consumo de oxigênio (Silva et al., 2009) e a oxidação de ácidos graxos (Van der et al., 2009) aumentam consideravelmente, ao avaliar estresse oxidativo em modelos de treinamento, o músculo é um órgão importante para análise. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes intensidades de exercício no perfil lipídico/morfológico hepático, estresse oxidativo hepático e muscular de camundongos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica.

## **2. Métodos**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, com cinco semanas de idade, massa corporal =  $27,3 \pm 1,2$  gramas, obtidos do Centro de Experimentação

Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e mantidos no mesmo local. Os animais tiveram livre acesso à dieta e água e foram mantidos individualmente em gaiolas de dimensões 30x20x13cm, em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas (7:00 às 19:00) e temperatura controlada (24 a 26°C). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFU (CEUA/UFU) com protocolo de número 063/11.

## **2.2 Delineamento experimental e dieta**

Inicialmente os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: grupo controle, que recebeu dieta padrão (DP), e grupo obeso, que recebeu dieta hiperlipídica (DH). Os animais permaneceram com as respectivas dietas durante todo o experimento. Após oito semanas, os grupos DP e DH foram divididos em três grupos: sem exercício (SEX), exercício de baixa intensidade (EXB) e exercício de moderada intensidade (EXM), cada grupo contendo 6 animais (**Figura 1**).

Para indução da obesidade, os animais dos grupos obesos foram alimentados com dieta hiperlipídica, com 59% do conteúdo calórico em forma de gordura. Os animais dos grupos controle foram alimentados com dieta padrão com 9% do fornecimento calórico sob a forma de gordura. Os componentes e percentuais de cada componente da dieta padrão e da dieta hiperlipídica estão listados na **tabela 1**. A composição energética das dietas está listada na **tabela 2**.

## **2.3 Evolução Ponderal, ganho de peso acumulado e adiposidade**

Os animais foram pesados semanalmente, em balança semi-analítica, para avaliar a evolução ponderal. No dia que antecedeu ao sacrifício os animais foram pesados para a mensuração do peso corporal final. O ganho de peso acumulado foi obtido pela diferença entre os pesos final e inicial de cada animal. Após o sacrifício, o tecido adiposo epididimal e fígado foram retirados e pesados. O músculo gastrocnêmio também foi retirado para análise.

## **2.4 Treinamento**

O treinamento foi realizado durante 7 semanas, às 7 horas da manhã com o ambiente escuro, respeitando o ciclo do animal, 5 vezes por semana, com duração de 1 hora cada sessão. A primeira semana foi de adaptação ao meio líquido, que consistiu na natação sem carga por 10 minutos 5 vezes na semana. A adaptação e o treinamento foram realizados em um aquário com as seguintes dimensões: altura de 280 mm, comprimento 900 mm e largura 300 mm, divididos em 12 compartimentos de dimensões 150 x 150 mm, a fim de alojar cada camundongo individualmente.

Após a semana de adaptação, os animais dos grupos exercício de baixa e moderada intensidade foram submetidos ao protocolo de carga progressiva até exaustão para determinação da carga de treino. O teste foi realizado individualmente, com água à temperatura de  $32 \pm 3^{\circ}\text{C}$  (Evangelista et al., 2003).

O teste incremental consistiu no acréscimo de carga de 2% do peso corporal a cada 3 minutos até a exaustão do animal, iniciando o teste já com 2% atado à cauda (Almeida et al., 2009). Uma vez afixada a sobrecarga, o camundongo era lançado à água e disparava-se o cronômetro. Foi caracterizada exaustão a permanência do animal submerso por 4 segundos e com mudança no padrão do nado (Almeida et al., 2009).

Os animais do grupo exercício de moderada intensidade realizaram o treinamento com 50% da carga atingida no teste incremental, enquanto o grupo exercício de baixa intensidade não teve acréscimo de carga à cauda, durante as 7 semanas de treinamento.

## **2.5 Eutanásia**

Após as 16 semanas de experimento, com 24 horas da ultima sessão de treino, após jejum de 4 horas, sob anestesia (diazepam, cetamina e xilazina – 1:2:2 0,20mL/25g de peso corporal), os animais foram eutanaziados para a coleta dos tecidos. Os tecidos (fígado, tecido adiposo epididimal e músculo - gastrocnêmio) foram retirados dos animais, perfundidos com tampão fosfato (50mM pH 7,4), secos em papel filtro, pesados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as

análises posteriores. Parte do fígado (lobo direito) e do tecido adiposo epididimal foi colocada em formol 10% para análise histológica.

## **2.6 Análise morfológica e morfométrica**

Após fixação os fragmentos de tecido adiposo e hepático foram processados rotineiramente, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo a 5 $\mu$ m de espessura. Os cortes foram então corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia de luz.

A análise morfométrica do tecido adiposo foi feita no programa de análise de imagens *imageJ* versão 1.47 (*Wayne Rasband National Institute of Health, USA*). O software foi calibrado para análises de medidas de imagens geométricas utilizando imagem com objeto de tamanho conhecido (régua de calibração de 1mm - Lâmina Micrométrica Divisão 0,01mm, marca PZO). As células do tecido adiposo analisadas foram selecionadas pela técnica de amostragem consecutiva, não probabilística. Para utilização dessa técnica cada imagem foi dividida em 99 quadrantes. Em seguida os quadrantes foram convertidos em oitenta (80) pontos que formavam oito linhas imaginárias, de 10 pontos cada (quando interligados horizontalmente da esquerda para direita), cada ponto representava a intersecção de quatro quadrantes. Assim, os adipócitos foram selecionados segundo os seguintes critérios: adipócitos que apresentavam o ponto de intersecção dos quadrantes o mais próximo do centro da célula, selecionados da esquerda para direita e da primeira à oitava linha imaginária. Em cada imagem foram analisadas 20 células.

## **2.7 Perfil lipídico hepáticos**

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos de acordo com o método de (Folch et al., 1957). Em resumo, 100 mg da amostra foi homogeneizada com 1900 $\mu$ L de solução clorofórmio:metanol 2:1. Após este procedimento, foram adicionados 400 $\mu$ L de metanol ao material que foi centrifugado a 3.000 rpm, durante dez minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo (previamente pesado) e adicionados 800 $\mu$ L de clorofórmio e 640 $\mu$ L de solução de NaCl a

0,73%, realizando-se nova centrifugação a 3.000 rpm, durante dez minutos. Desta vez, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado por três vezes com 600 $\mu$ L da solução de Folch (3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,2%). Os extratos lipídicos foram secos em estufa a 37°C e os tubos pesados novamente. Para análise de colesterol e triglicerídeos o extrato lipídico foi suspenso em 500 $\mu$ L de isopropanol e foi utilizado quite enzimático (labtest) para as análises.

## **2.8 Análise do estresse oxidativo muscular e hepático**

### **2.8.1 Avaliação da peroxidação lipídica - TBARS**

A quantificação de TBARS representa um método de mensuração de peroxidação lipídica. O método consiste na análise dos produtos da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff, que podem ser lidas espectrofotometricamente.

A mensuração dos metabólitos reativos ao TBA foi realizada pelo método descrito por (Buege e Aust, 1978). O fígado (100 mg) foi homogeneizado em 900 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugados por 6 minutos a 10.000xg. Desta solução, 400 $\mu$ L de cada amostra foi colocado em microtubos e foram adicionados 400 $\mu$ L de TCA 20%. Dessa nova diluição foram separados tubos para o branco e tubos para o teste, sendo 400 $\mu$ L da amostra e 600 $\mu$ L de ácido clorídrico (HCl) 0,5M para o branco. Para o teste, 400 $\mu$ L da amostra e 600 $\mu$ L de TBA a 0,75% em HCl 0,5M e BHT 0,1mM. As amostras foram mantidas em banho-maria (entre 90 e 95 °C) por 15 minutos e depois centrifugadas por 6 minutos a 10.000xg. O sobrenadante foi usado para leitura no espectrofotômetro a 532 nm e a 600nm.

Para o cálculo consideramos o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (156 mmol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).g<sup>-1</sup> de tecido.

## 2.8.2 - Avaliação de proteínas carboniladas

A presença de proteínas carboniladas é um indicador de danos oxidativos protéicos. Esta técnica avalia a quantidade de carbonil, que são produtos resultantes do ataque dos radicais livres às proteínas utilizando 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH). Os grupos carbonil reagem com DNPH para formar 2,4-dinitrofenil hidrazona, que absorve luz em 370nm. Os resultados são apresentados em concentração de proteínas carboniladas por nanomol de proteína.

Do homogenato preparado para análise de peroxidação lipídica (100 mg de fígado em 900 $\mu$ l de TCA 10%) foi utilizado o precipitado, após centrifugação (6 minutos a 10.000xg), para dosagem de proteína carbonilada. Foram separados dois microtubos contendo o precipitado em mesma quantidade, sendo, um destinado ao teste (adicionado 0,5mL de DNPH 10mM em HCl 2M) e outro ao branco (0,5mL de HCl 2M) (Fields e Dixon, 1971; Levine et al., 1990).

O precipitado foi dissolvido e os microtubos mantidos por 1h em temperatura ambiente e no escuro. Após esse processo, foi adicionado 500 $\mu$ L de TCA 20%, para retirar excesso de corante, lipídios e precipitar proteínas. Foram mantidos em gelo por 10 minutos, para, então, realizar a centrifugação (6 min a 10.000xg). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol:acetato de etila (1:1), ressuspensendo o precipitado para realizar nova centrifugação (6 min a 10.000g) da qual foi descartado o sobrenadante. Tal etapa foi repetida 2 vezes, e em seguida foi adicionado 1 mL e cloreto de guanidina 6M para dissolver o precipitado. No passo seguinte, as amostras foram incubadas por 15 minutos em banho maria (37°C). Foi realizada nova centrifugação (6 min a 10.000xg). Nessa centrifugação, dois microtubos contendo 1,5mL da solução pura de cloreto de guanidina (aparentemente, nesta solução, há resíduos que absorvem luz, pois a absorbância, próxima de 370nm, diminui após a centrifugação) foram adicionados, do qual, retirou-se 800 $\mu$ L para realizar a leitura, em espectrofotômetro, a 370nm, “zerando” o equipamento com a solução pura, para então, realizar a leitura do branco e teste (800 $\mu$ L a 370nm) (Fields e Dixon, 1971; Levine et al., 1990).

O cálculo for realizado sabendo que 1mM absorve 22 mM<sup>-1</sup> (coeficiente de absorção do complexo Ptn-DNPH) a 370 nm. Assim, a diferença de absorbância entre teste e branco é dividida por 22 e o valor encontrado é dividido por 0,8 (volume do homogeneizado utilizado) para então ser multiplicado pela diluição e por fim dividido pela concentração de proteína obtida no Bradford (Bradford, 1976).

### **2.8.3 Avaliação da atividade da catalase**

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em  $H_2O$  e  $O_2$ . Sua atividade foi medida através da degradação do  $H_2O_2$  pela variação de absorbância a 240nm (Aebi, 1984).

As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato 50mM (100mg de tecido em 900 $\mu$ L de tampão), deste homogeneizado, diluiu-se 50 vezes as amostra hepáticas. Para o músculo não foi feita nova diluição. Todas as leituras foram feitas em cubeta de quartzo. O branco foi lido previamente às amostras, contendo apenas tampão fosfato (890 $\mu$ L), em seguida, foram lidas adicionando-se à cubeta 100 $\mu$ L da solução de trabalho (Peróxido de Hidrogênio a 30%) e, por último, acrescentado 10  $\mu$ L do homogeneizado para leitura da cinética. O consumo do peróxido de hidrogênio foi monitorado durante 60 segundos, anotando-se as absorbâncias a cada intervalo de 15 segundos (Aebi, 1984).

Para determinar a atividade da catalase foi calculada a taxa líquida da variação da absorbância a 240nm ao longo do tempo (cinética); (Abs 0seg – abs 60seg); para então obter a atividade na cubeta ( $\mu$ mol/mL) dividindo a taxa líquida da variação da absorbância pelo coeficiente de extinção molar do substrato ( $H_2O_2 = 0,04$ ). Uma unidade (U) é a quantidade de enzima que utiliza 1 $\mu$ mol de substrato por minuto e para encontrar a atividade por grama de tecido, multiplica-se a atividade na cubeta (U/mL) pela diluição final. Por fim dividi-se a atividade pela concentração de proteína obtida no Bradford (Bradford, 1976).

#### **2.8.4 - Avaliação da atividade antioxidante total**

A atividade antioxidante total foi avaliada por meio da redução do ferro no estado férrico ( $Fe^{3+}$ ) para o estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) em pH ácido, formando o complexo ferro-tripiridiltiazina ( $Fe^{2+}TPTZ$ ) de coloração azul intensa, mensurado espectofotometricamente a 593 nm (Benzie e Strain, 1996). Os reagentes incluem tampão acetato de sódio (300 mmo/L pH 3,66), e 16 mL de  $C_2H_4O_2$  por litro de tampão; 10 mmol .  $L^{-1}$  de TPTZ preparado em HCL a 40 mmol. $L^{-1}$  e cloreto férrico ( $FeCl_3.6H_2O$ ) a 20 mM, preparado no tampão acetato de sódio (300 mM.  $L^{-1}$ , pH 3,6). O reagente de trabalho foi preparado adicionando-se 25 mL de tampão acetato de sódio, 2,5 mL da solução de TPTZ e 2,5 mL da solução de  $FeCl_3.6H_2O$ , sendo aquecido a 37°C por cinco minutos. Na microplaca foram adicionados 10  $\mu$ L da amostra, 25  $\mu$ L de água destilada e 250  $\mu$ L do reagente de trabalho, incubados a 37°C por seis minutos. A absorbância foi mensurada em espectofotômetro a 593 nm utilizando uma leitora de microplaca. A atividade antioxidante total foi calculada, baseada na curva padrão, construída a partir de trolox, nas concentrações de 1000, 800, 400, 200 e 50  $\mu$ M. Os reagentes foram preparados imediatamente antes do experimento.

#### **2.9 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos em média e erro padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição normal das amostras. A diferença entre os grupos foi realizada por ANOVA One-Way, seguida do pós-teste de Tukey. Para verificar o efeito do exercício, foi utilizado o pós-teste de Dunnett, sendo o grupo SEX-DP controle dos grupos DP e o grupo SEX-DH, controle dos grupos DH. Para verificar o efeito da dieta o grupo SEX-DP foi controle do grupo SEX- DH. Um nível de significância de 0,05 foi estabelecido. As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA.

### 3. Resultados

#### 3.1. Evolução ponderal e ganho de peso acumulado

A **Figura 2** mostra a evolução (A) e o ganho de peso acumulado (B) dos animais ao longo do período experimental. Os animais alimentados com dieta hiperlipídica (DH), apresentaram maior ganho de massa corporal quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão (DP). Destes, os animais alimentados com dieta hiperlipídica que não realizaram exercício (SEX-DH), apresentaram maior ganho de peso durante todo o período experimental. Foi observada diferença apenas no efeito da dieta para tais variáveis, uma vez que o grupo SEX-DH apresentou peso final e ganho de peso maior que o grupo SEX-DP ( $p<0,01$ ), não foi observado efeito do treinamento.

#### 3.2 Avaliação do peso do fígado e tecido adiposo

A **tabela 3** mostra o peso do tecido adiposo epididimal e do fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais. O peso do tecido adiposo dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica foi maior que dos alimentados com dieta padrão. Observamos efeito da dieta, já que houve diferença entre os grupos SEX-DP e SEX-DH ( $p<0,001$ ). Os grupos exercício de moderada e baixa intensidade não apresentaram diferença em relação aos grupos sem exercício de seus respectivos grupos. Para o peso do fígado, foi encontrado diferença apenas entre o grupo EXM-DP e o SEX-DH, o segundo apresentando maior peso. O exercício não apresentou efeito sobre estes parâmetros.

#### 3.3 Análise morfométrica do tecido adiposo e efeito do treinamento

As análises histológicas e morfométricas ilustram e comprovam que houve expansão do tecido adiposo, uma vez que o tecido adiposo de todos os grupos com dieta hiperlipídica apresentou perímetro ( $p<0,001$ ) e área ( $p<0,001$ ) dos adipócitos maiores em comparação aos grupos com dieta padrão (Figura 3). O exercício, em nenhuma das intensidades realizadas, foi capaz de reduzir a área e

perímetro dos adipócitos. Verificamos apenas efeito da dieta, uma vez que o grupo SEX-DH apresentou maior área e perímetro dos adipócitos que o grupo SEX-DP ( $p<0,001$ ), não foi observado efeito do treinamento.

### **3.4 Parâmetros lipídicos e de estresse oxidativo hepático e muscular**

Nos animais com dieta hiperlipídica a quantidade de lipídeos totais e triglicerídeos foi maior (Tabela 4). A histologia do tecido evidencia a presença de esteatose hepática nos grupos com dieta hiperlipídica, mesmo que a mesma esteja atenuada no grupo EXM-DH (Figura 4). Os dados mostram efeito da dieta e do exercício para lipídeos totais (Tabela 4), uma vez que houve diferença entre os grupos SEX-DP e SEX-DH ( $p<0,001$ ) e, também, entre SEX-DH e EXM-DH ( $p<0,01$ ). Quanto aos triglicerídeos, foi observado apenas efeito da dieta (SEX-DP e SEX-DH;  $p<0,001$ ).

Com relação às análises bioquímicas de estresse oxidativo no fígado, observamos, na análise entre grupos, que o grupo EXM-DH apresentou peroxidação lipídica (TBARS – Figura 5A), maior que os grupos EXM-DP ( $p < 0,001$ ), EXB-DP ( $p < 0,01$ ), SEX-DP ( $p < 0,001$ ) e ESC-DH ( $p < 0,05$ ). Ao avaliar o efeito do exercício, foi encontrada diferença entre SEX-DH e EXM-DH ( $p<0,01$ ), com maior peroxidação lipídica do grupo exercício de moderada intensidade. Para análise de dano proteico (proteína carbonilada – Figura 5 B) não foi encontrada diferença entre os grupos, nem efeito da dieta e do treinamento. A análise da atividade da catalase (Figura 6 A) mostra maior atividade da enzima no grupo EXM-DP em relação ao EXM-DH ( $p < 0,01$ ), EXB-DH ( $p < 0,001$ ) e SEX-DH ( $p < 0,001$ ), enquanto que a análise da atividade antioxidante total (FRAP – Figura 6 B) não apresentou diferença entre os grupos, não foi encontrado efeito da dieta e do treinamento.

As análises de estresses oxidativo no músculo apontam diferença da peroxidação lipídica (TBARS – Figura 7 A) entre o grupo EXM-DP e SEX-DH ( $p < 0,05$ ) e pela proteína carbonilada (Figura 7 B) entre SEX-DP e EXM-DH ( $p < 0,05$ ), em que os grupos DP, EXM-DP e SEX-DP, apresentaram menor dano lipídico e proteico, respectivamente. Observamos efeito da dieta na peroxidação lipídica muscular, uma vez que a mesma foi maior no grupo SEX-DP em relação

ao grupo SEX-DH ( $p<0,01$ ). A atividade da enzima catalase não foi diferente entre grupos, no entanto, a atividade antioxidante total (FRAP – Figura 8 B) foi maior no grupo EXM-DP em relação ao EXM-DH ( $p < 0,01$ ), EXB-DH ( $p < 0,01$ ) e SEX-DH ( $p < 0,01$ ). Foi observado efeito do exercício apenas no grupo dieta padrão para atividade antioxidante total (FRAP), com diferença entre SEX-DP e EXM-DP ( $p<0,01$ ).

#### **4. Discussão**

A gordura dietética é um dos fatores ambientais mais importantes associados com a incidência de obesidade e outras doenças como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares. Estudos mostram que a oferta de dietas hiperlipídicas tem influência no aumento do peso corporal, no armazenamento de gordura, no teor de triglicerídeos hepáticos e na frequência de esteatose hepática (Hsu e Yen 2007), assim como aumento na produção de radicais livres (Huang e Fwu, 1992; Turpeinen et al., 1995), sem adaptação endógena antioxidante (Greathouse et al., 2005; Noeman et al., 2011), fatores que contribuem para o quadro de estresse oxidativo.

Neste estudo, o treinamento não foi suficiente para reduzir o maior ganho de massa corporal e de tecido adiposo causado pela dieta hiperlipídica. Contudo, é importante destacar efeitos benéficos do exercício, mesmo sem redução de peso e de tecido adiposo, tais como a redução na expressão de marcadores inflamatórios (Kawanishi et al., 2010) e a redução da esteatose hepática. Uma vez que verificamos redução da esteatose hepática no grupo exercício de moderada intensidade, assim como no estudo realizado por Gonçalves et al. (2014), o qual destaca que este fenótipo protetor do exercício, parece ser mediado, pelo menos em parte, pelas alterações favoráveis na integridade da membrana mitocondrial e por uma modulação positiva da  $\beta$ -oxidação. No entanto, tais respostas ocorreram, tanto em nosso trabalho, quanto no do Gonçalves et al. (2014), apenas nos grupos com intensidade moderada, enfatizando a importância do papel da intensidade do exercício contra efeitos deletérios da esteatose hepática.

Entretanto, o treinamento de moderada intensidade aumentou a peroxidação lipídica hepática no grupo que ingeriu dieta hiperlipídica, dados que

corroboram com estudo de Burneiko et al. (2006), que encontrou aumento da peroxidação lipídica e redução de antioxidantes no fígado de roedores que realizaram exercício e ingeriram dieta hiperlipídica. Sem avaliar o parâmetro exercício, estudo de Noeman et al., (2011), mostrou a dieta hiperlipídica como fator para aumento do dano oxidativo e redução da atividade de enzimas antioxidantes no fígado. Têm sido descrito em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica: morfologia mitocondrial anormal e stress oxidativo, assim como defeito na síntese de ATP (Cortez-Pinto et al, 1999; Perez-Carreras et al., 2003). Estudos têm demonstrado (Mantena et al., 2009; Gonçalves et al. 2014), que a alimentação rica em gordura (induzida) causa disfunção respiratória mitocondrial, por comprometimento dos complexos da cadeia de transporte de elétrons. Assim, apesar do treinamento, a manutenção da dieta hiperlipídica parece contribuir para a peroxidação lipídica aumentada.

No músculo, o dano oxidativo protéico foi maior no grupo EXM-DH. Assim como no fígado, o aumento da atividade antioxidante ocorreu apenas no grupo EXM-DP. O conteúdo da dieta parece desempenhar papel importante, também, na peroxidação lipídica muscular, uma vez que encontramos diferença entre SEX-DP e SEX-DH. Considerando que as enzimas antioxidantes parecem responder de maneira adaptativa ao exercício, elevando suas atividades no músculo (Ohishi et al., 1997; Pereira et al., 1994; Silva et al., 2009; Terblanche, 2000), mas que tal adaptação ocorre em resposta à pequena produção de EROs oriunda do exercício (Pinho et al., 2006), uma vez que a dieta hiperlipídica está associada a danos oxidativos e redução da atividade de enzimas antioxidantes, e a obesidade está associada à inflamação devido ao aumento de citocinas pro-inflamatórias e consequente aumento na produção de EROs (Harwood, 2012; Lofrano-Prado et al., 2009; Wang et al., 2014), tais fatores podem ter contribuído para maior dano oxidativo no músculo.

## 5. Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que o conteúdo da dieta parece ser importante na peroxidação lipídica muscular, uma vez que encontramos diferença entre SEX-DP e SEX-DH na peroxidação lipídica muscular. O exercício de

moderada intensidade foi importante na redução da esteatose hepática e do conteúdo lipídico total deste tecido, mas não foi eficiente na redução de massa corporal e tecido adiposo, assim como não reduziu danos oxidativos hepáticos e musculares.

## **Agradecimentos**

Os autores expressam sua gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. Declaramos não haver conflito de interesse.

## **6. Referências**

Adams, L.A, Lymp, J. F., Sauver, J. St., et al., 2005, The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study: Gastroenterology, v. 129, p. 113–121.

Aebi, H., 1984, Catalase in vitro: Methods Enzymol, v. 105, p. 121-6.

Akagiri, S., Y. Naito, H. Ichikawa, K. Mizushima, T. Takagi, O. Handa, S. Kokura, and T. Yoshikawa, 2008, A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice: J Clin Biochem Nutr, v. 42, p. 150-7.

Almeida, P. W., A. Gomes-Filho, A. J. Ferreira, C. E. Rodrigues, M. F. Dias-Peixoto, R. C. Russo, M. M. Teixeira, G. D. Cassali, E. Ferreira, I. C. Santos, A. M. Garcia, E. Silami-Garcia, U. Wisloff, and G. A. Pussieldi, 2009, Swim training suppresses tumor growth in mice: J Appl Physiol (1985), v. 107, p. 261-5.

Benzie, I. F., and J. J. Strain, 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay: Anal Biochem, v. 239, p. 70-6.

Bonen A, Campbell S.E, Benton C.R, et al., 2004, Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36: Proc Nutr Soc, v. 63, p. 245-9.

Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: Anal Biochem, v. 72, p. 248-54.

Buege, J. A., Aust ,S. D., 1978, Microsomal lipid peroxidation: Methods Enzymol, v. 52, p. 302-10.

Buettner, R., J. Scholmerich, and L. C. Bollheimer, 2007, High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents: *Obesity* (Silver Spring), v. 15, p. 798-808.

Burneiko, R.C.M., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Rodrigues, H.G., Ebaid, G.M.X., Faine, L.A., Padovani, C.R., Cicogna, A.C., Novelli, E.L.B., 2006, Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses: *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 1167–1172.

Carvalho, E.A.A, et al., 2013, Obesidade: aspectos epidemiológicos e prevenção: *Rev Med Minas Gerais*, v. 23, p. 74-82.

Cintra, D.E, Ropelle, E.R, Vitto, M.F, et al., 2012, Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: the role of sterol regulatory element-binding protein-1c: *Life Sci*, v. 91, p.395-401.

Coelho, B. L., L. G. Rocha, K. S. Scarabelot, D. L. Scheffer, M. M. Ronsani, P. C. Silveira, L. A. Silva, C. T. Souza, and R. A. Pinho, 2010, Physical exercise prevents the exacerbation of oxidative stress parameters in chronic kidney disease: *J Ren Nutr*, v. 20, p. 169-75.

Cortez-Pinto, H., Chatham, J., Chacko, V.P., Arnold, C., Rashid, A., Diehl, A.M., 1999, Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study: *JAMA*., v.17, p.1659-64.

Day, C. P., James, O. F. W., 1998, Steatohepatitis: a tale of two “hits”?: *Gastroenterology*, v. 114, p. 842–845.

Demori, I., A. Voci, E. Fugassa, and B. Burlando, 2006, Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver: *Alcohol*, v. 40, p. 185-91.

Dowman, J. K., Tomlinson, J.W., Newsome, P.N., 2010, Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: *QJM*, v. 103, p. 71–83.

Enes, C.C. Slater, B, 2010, Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes: *Rev Bras Epidemiol*, v. 13, p. 163-71.

Evangelista, F. S., P. C. Brum, and J. E. Krieger, 2003, Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice: *Braz J Med Biol Res*, v. 36, p. 1751-9.

Farrell, C.D., Larter, C.Z., 2006, Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis: *Hepatology*, v. 43, p. S99–S112.

Fields, R., and H. B. Dixon, 1971, Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2,4-dinitrophenylhydrazine: Biochem J, v. 121, p. 587-9.

Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, 1957, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues: J Biol Chem, v. 226, p. 497-509.

Frederico, M. J., S. L. Justo, G. Da Luz, S. Da Silva, C. Medeiros, V. A. Barbosa, L. A. Silva, C. R. Boeck, R. A. De Pinho, and C. T. De Souza, 2009, Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol: Free Radic Res, v. 43, p. 957-64.

Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech, and J. Vina, 2008, Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training: Free Radic Biol Med, v. 44, p. 126-31.

Goncalves, I. O., E. Passos, S. Rocha-Rodrigues, C. V. Diogo, J. R. Torrella, D. Rizo, G. Viscor, E. Santos-Alves, I. Marques-Aleixo, P. J. Oliveira, A. Ascensao, and J. Magalhaes, 2014, Physical exercise prevents and mitigates non-alcoholic steatohepatitis-induced liver mitochondrial structural and bioenergetics impairments: Mitochondrion, v. 15, p. 40-51.

Greathouse, K.L., Samuels, M., DiMarco, N.M., Criswell, D.S., 2005, Effects of increased dietary fat and exercise on skeletal muscle lipid peroxidation and antioxidant capacity in male rats: Eur J Nutr, v. 44, p. 429–435.

Harwood, H. J., Jr., 2012, The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis: Neuropharmacology, v. 63, p. 57-75.

Hill, J. O., H. R. Wyatt, G. W. Reed, and J. C. Peters, 2003, Obesity and the environment: where do we go from here?: Science, v. 299, p. 853-5.

Hsu, C. L., Yen, G. C, 2007, Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats: Br J Nutr, v. 98, p. 727-35.

Huang, C.J, Fwu, M.L, 1992, Protein insufficiency aggravates the enhanced lipid peroxidation and reduced activities of antioxidative enzymes in rats fed diets high in polyunsaturated fat: J Nutr., v.5, p.1182-9.

Kawanishi, N., H. Yano, Y. Yokogawa, and K. Suzuki, 2010, Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice: Exerc Immunol Rev, v. 16, p. 105-18.

Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel, and E. R. Stadtman, 1990, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins: *Methods Enzymol*, v. 186, p. 464-78.

Lin, Z., Zhou, Z., Liu, Y., et al., 2011, Circulating FGF21 levels are progressively increased from the early to end stages of chronic kidney diseases and are associated with renal function in Chinese: *PLoS ONE*, v. 6.

Lofrano-Prado, M. C., H. K. Antunes, W. L. do Prado, A. de Piano, D. A. Caranti, L. Tock, J. Carnier, S. Tufik, M. T. de Mello, and A. R. Damaso, 2009, Quality of life in Brazilian obese adolescents: effects of a long-term multidisciplinary lifestyle therapy: *Health Qual Life Outcomes*, v. 7, p. 61.

Mantena, S.K., Vaughn, D.P., Andringa, K.K., Eccleston, H.B., King, A.L., Abrams, G.A., Doeller, J.E., Kraus, D.W., Darley-Usmar, V.M., Bailey, S.M., 2009, High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo: *Biochem J.*, v.1,p. 183-93.

Menegali, B. T., R. T. Nesi, P. S. Souza, L. A. Silva, P. C. Silveira, S. S. Valenca, and R. A. Pinho, 2009, The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response: *Pulm Pharmacol Ther*, v. 22, p. 567-73.

Nestel P., Lyu R., Low L.P., Sheu W.H., Nitiyanant W., Saito I., Tan C.E., 2007, Metabolic syndrome: recent prevalence in East and Southeast Asian populations: *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, v.16, p.362–367.

Noeman, S. A., H. E. Hamooda, and A. A. Baalash, 2011, Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats: *Diabetol Metab Syndr*, v. 3, p. 17.

Oh-ishi, S., T. Kizaki, T. Ookawara, T. Sakurai, T. Izawa, N. Nagata, and H. Ohno, 1997, Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 156, p. 1579-85.

Pereira, B., L. F. Costa Rosa, D. A. Safi, M. H. Medeiros, R. Curi, and E. J. Bechara, 1994, Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats: *Physiol Behav*, v. 56, p. 1095-9.

Pérez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martín, M.A., Rubio, J.C., Martín, A., Castellano, G., Colina, F., Arenas, J., Solis-Herruzo, J.A., 2003, Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis: *Hepatology*.,v.4, p.999-1007.

Pinho, R. A., M. E. Andrade, M. R. Oliveira, A. C. Pirola, M. S. Zago, P. C. Silveira, F. Dal-Pizzol, and J. C. Moreira, 2006, Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise: *Cell Biol Int*, v. 30, p. 848-53.

Poirier, P., 2008, Targeting abdominal obesity in cardiology: can we be effective? :The Canadian Journal of Cardiology, v. 24, supplement D, pp. 13D–17D.

Rector, R.S, Thyfault, J.P, Morris, R.T, *et al.*, 2008, Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.294, p. G619-26.

Sakurai, T., T. Izawa, T. Kizaki, J. E. Ogasawara, K. Shirato, K. Imaizumi, K. Takahashi, H. Ishida, and H. Ohno, 2009, Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue: Biochem Biophys Res Commun, v. 379, p. 605-9.

Selassie, M., and A. C. Sinha, 2011, The epidemiology and aetiology of obesity: a global challenge: Best Pract Res Clin Anaesthesiol, v. 25, p. 1-9.

Silva, L. A., C. A. Pinho, K. S. Scarabelot, D. B. Fraga, A. M. Volpato, C. R. Boeck, C. T. De Souza, E. L. Streck, and R. A. Pinho, 2009, Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle: Eur J Appl Physiol, v. 105, p. 861-7.

Terblanche, S. E., 2000, The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats: Cell Biol Int, v. 23, p. 749-53.

Turpeinen AM, Alfthan G, Valsta L, Hietanen E, Salonen JT, Schunk H, Nyssonnen K, Mutanen M (1995) Plasma and lipoprotein lipid peroxidation in humans on sunflower and rapeseed oil diets. *Lipids* 30:485-492.

Tuon, T., S. S. Valvassori, J. Lopes-Borges, G. R. Fries, L. A. Silva, F. Kapczinski, J. Quevedo, and R. A. Pinho, 2010, Effects of moderate exercise on cigarette smoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice: Neurosci Lett, v. 475, p. 16-9.

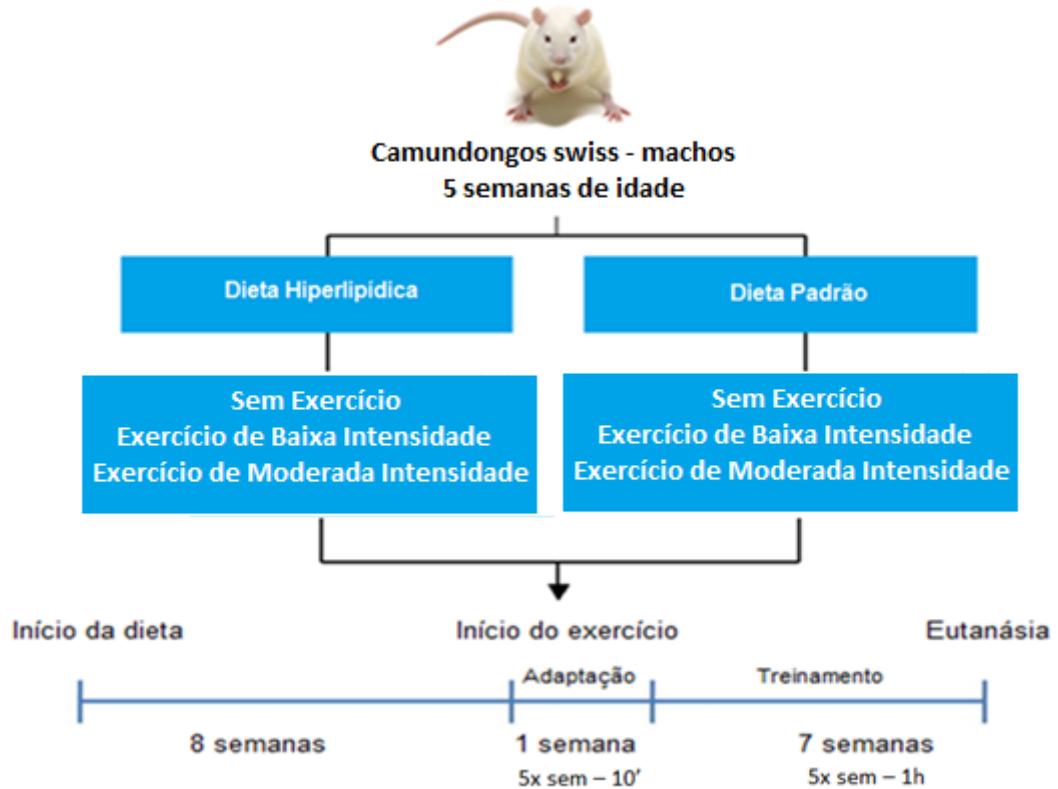
van der Heijden G.J, Toffolo G, Manesso E, Sauer PJ, Sunehag A.L., 2009, Aerobic exercise increases peripheral and hepatic insulin sensitivity in sedentary adolescents: J Clin Endocrinol Metab, v.94, p.4292-9.

Wang, J., C. Zhang, Z. Zhang, Q. Chen, X. Lu, M. Shao, L. Chen, H. Yang, F. Zhang, P. Cheng, Y. Tan, K. S. Kim, K. H. Kim, B. Wang, and Y. H. Kim, 2014, BL153 partially prevents high-fat diet induced liver damage probably via inhibition of lipid accumulation, inflammation, and oxidative stress: Oxid Med Cell Longev, v. 2014, p. 1-10.

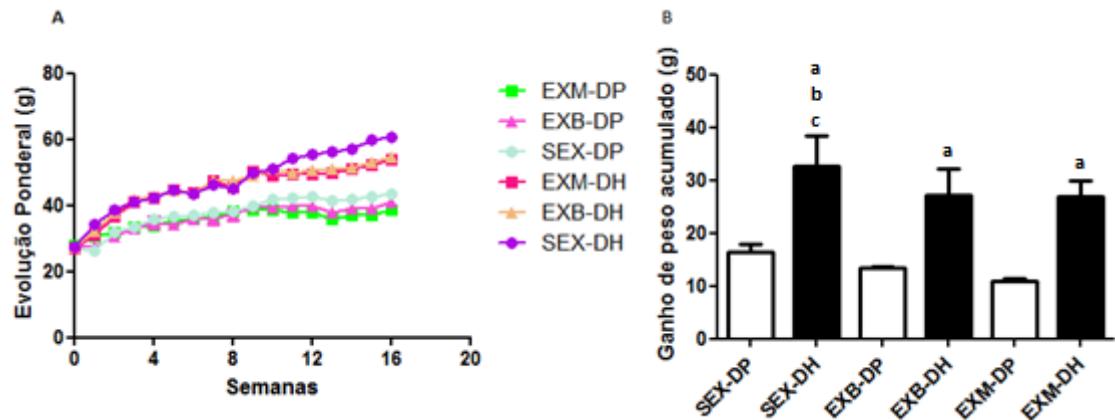
Watanabe S., Hojo M., 2007, Nagahara A. Metabolic syndrome and gastrointestinal diseases: J. Gastroenterol., v.42, p.267–274.

Xin, J., D. Zeng, H. Wang, X. Ni, D. Yi, K. Pan, and B. Jing, 2014, Preventing non-alcoholic fatty liver disease through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by attenuating inflammation and mitochondrial injury and improving gut environment in obese mice: Appl Microbiol Biotechnol.

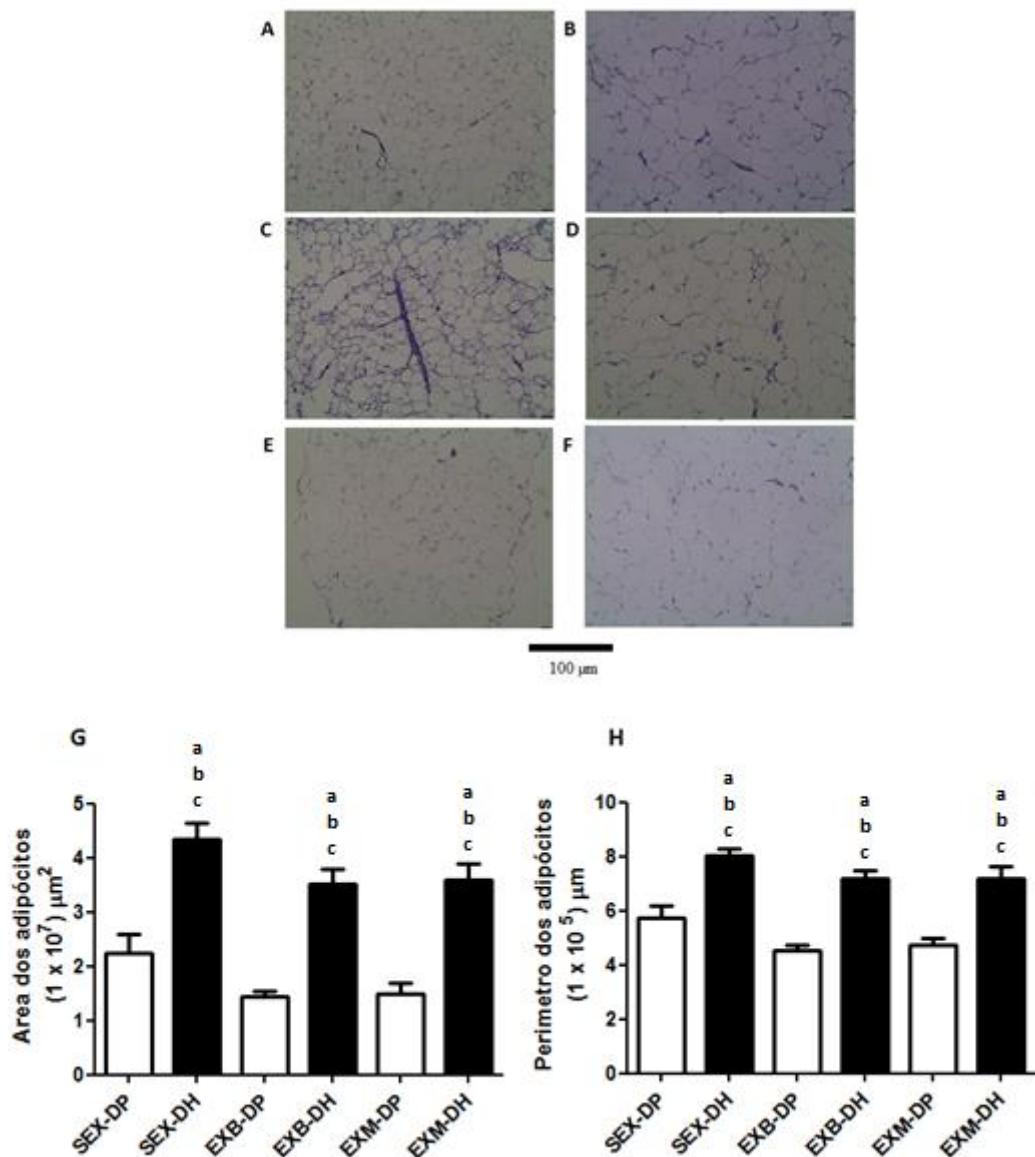
**Figura 1.** Desenho Experimental.



**Figura 2.** Evolução ponderal e ganho de peso acumulado

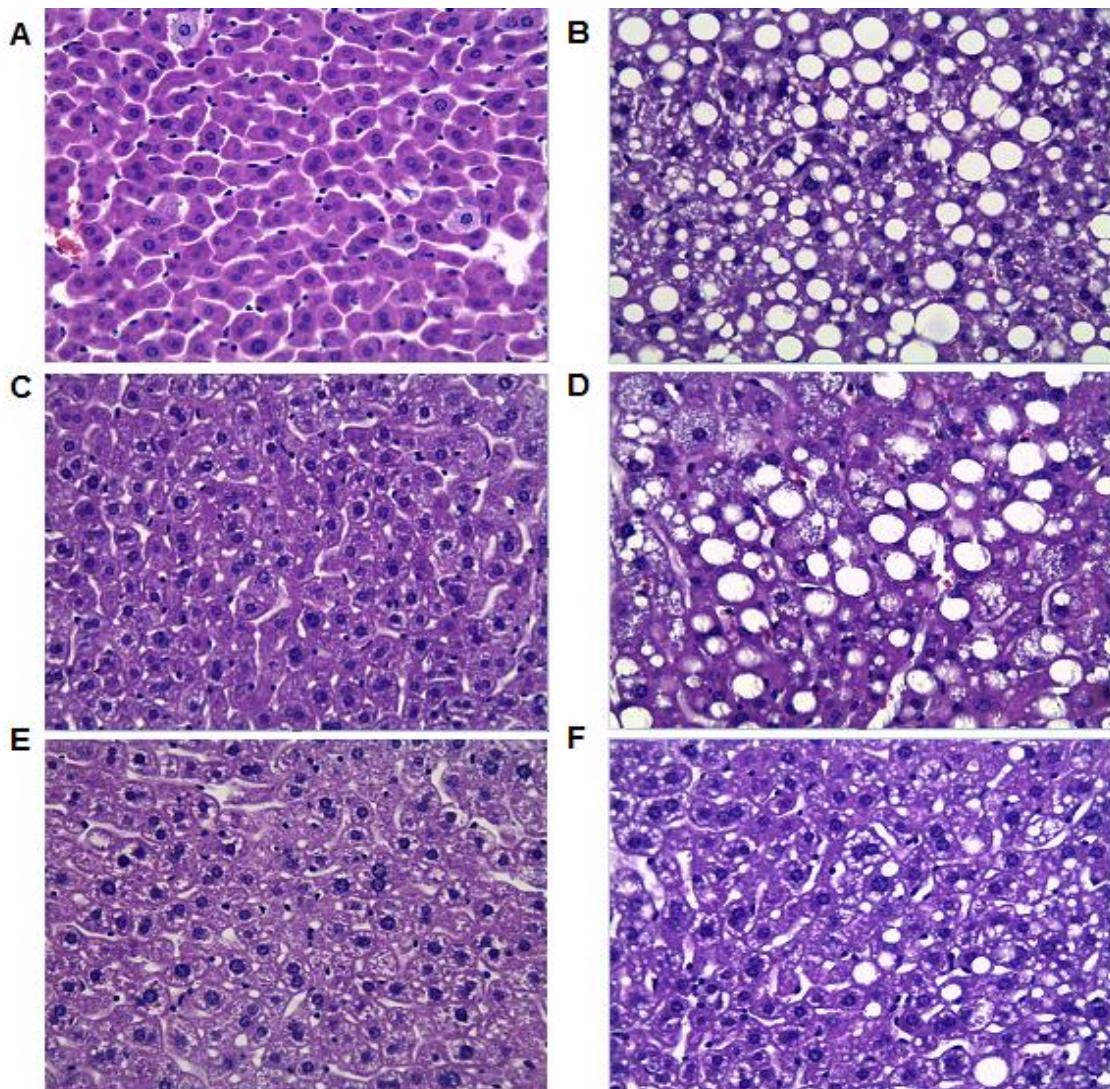


**Figura 3.** Histologia do tecido adiposo



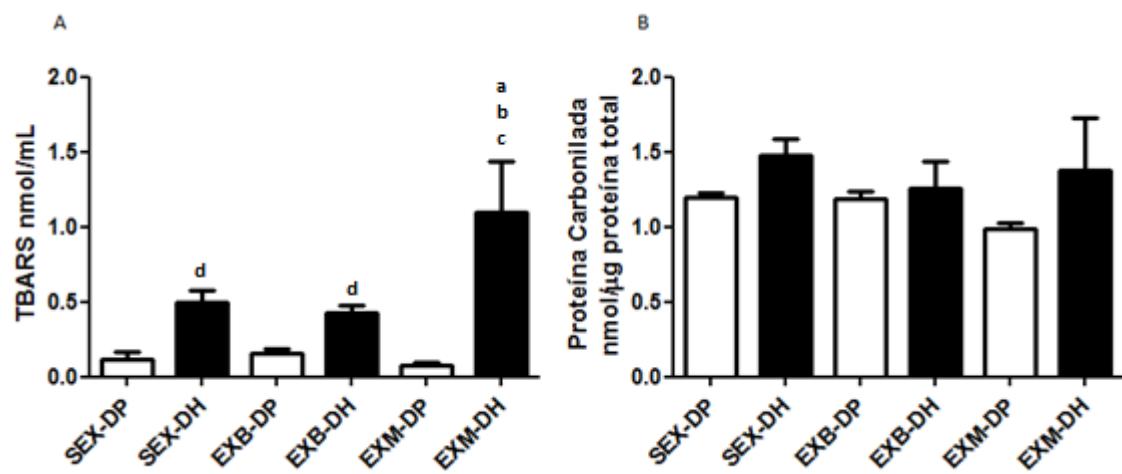
**Figura 3.** Histologia do tecido adiposo SEX-DP (A), SEX-DH (B), EXB-DP (C), EXB-DH (D), EXM-DP (E) e EXM-DH (F). Lente de 10 vezes. Análise morfológica da área (G) e do perímetro (H) de adipócitos. representados pela média  $\pm$  erro padrão. SEX-DP: controle sem exercício; SEX-DH: obeso sem exercício; EXB-DP: controle exercício de baixa intensidade; EXB-DH:obeso exercício de baixa intensidade; EXM-DP: controle exercício de moderada intensidade; EXM-DH:obeso exercício de moderada intensidade. “a”  $p<0,05$ , diferente do EXM-DP; “b”  $p<0,05$ , diferente do EXB-DP; “c”  $p<0,05$ , diferente do SEX-DP.

**Figura 4. Histologia hepática**



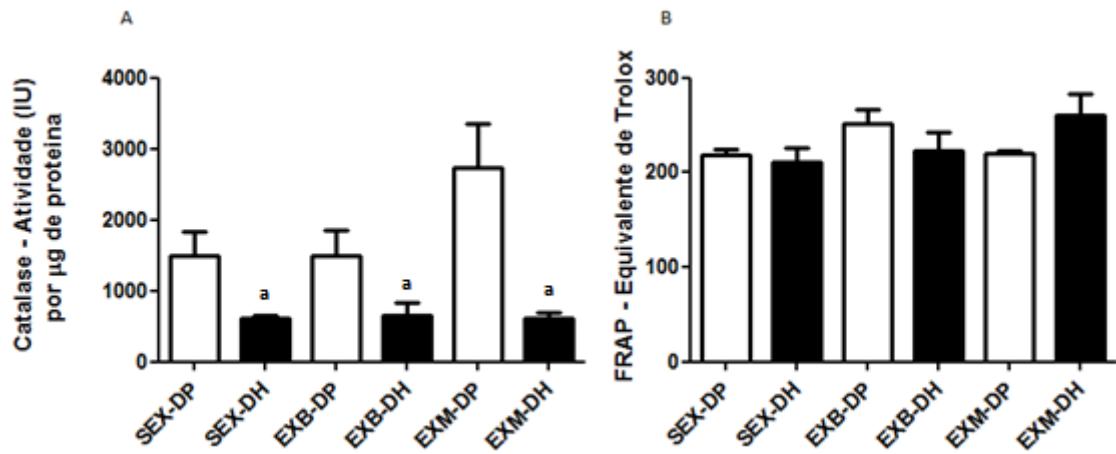
**Figura 4.** Fotomicrografias representativas das lesões hepáticas: SEX-DP (A), SEX-DH (B), EXB-DP (C), EXB-DH (D), EXM-DP (E) e EXM-DH (F). Aumento de 40X corados com HE.

**Figura 5.** Dano oxidativo hepático



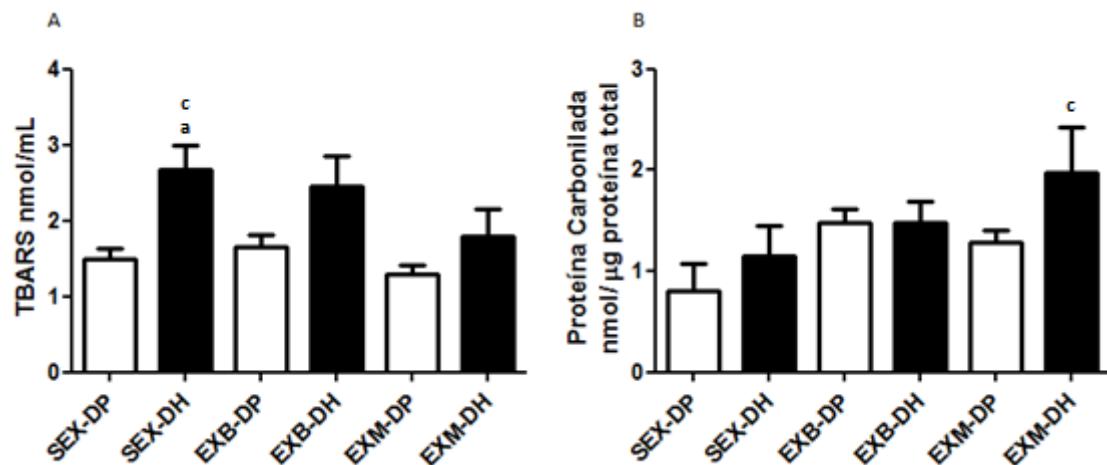
**Figura 5.** Dano oxidativo hepático. Peroxidação lipídica – TBARS (A); dano proteico – proteína carbonilada (B), representados pela média  $\pm$  erro padrão. SEX-DP: controle sem exercício; SEX-DH: obeso sem exercício; EXB-DP: controle exercício de baixa intensidade; EXB-DH:obeso exercício de baixa intensidade; EXM-DP: controle exercício de moderada intensidade; EXM-DH:obeso exercício de moderada intensidade. “a” p<0,05, diferente do EXM-DP; “b” p<0,05, diferente do EXB-DP; “c” p<0,05, diferente do SEX-DP; “d” p<0,05, diferente do EXM-DH.

**Figura 6.** Defesa antioxidante hepática



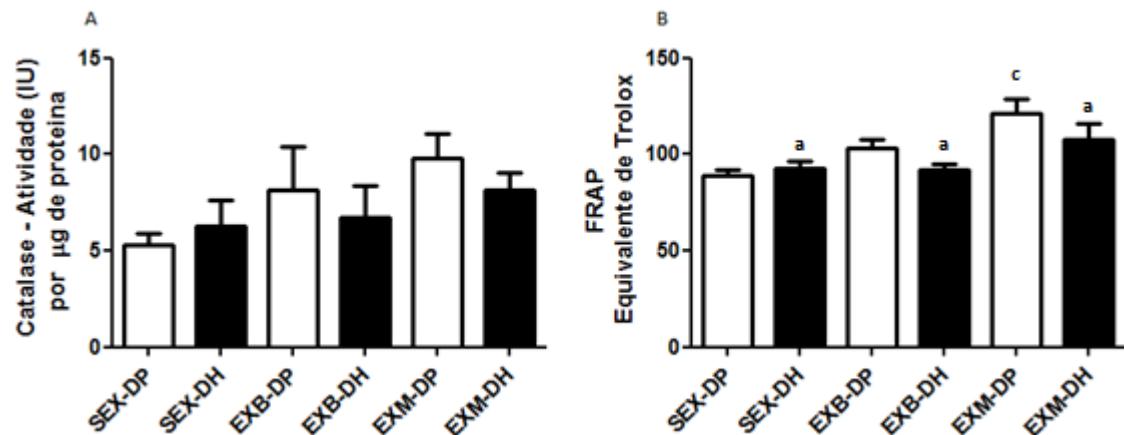
**Figura 6.** Defesa antioxidante hepático. Atividade da Catalase (A); Atividade antioxidante total - FRAP (B), representados pela média  $\pm$  erro padrão. SEX-DP: controle sem exercício; SEX-DH: obeso sem exercício; EXB-DP: controle exercício de baixa intensidade; EXB-DH:obeso exercício de baixa intensidade; EXM-DP: controle exercício de moderada intensidade; EXM-DH:obeso exercício de moderada intensidade. “a”  $p<0,05$ , diferente do EXM-DP.

**Figura 7.** Dano oxidativo muscular



**Figura 7.** Dano oxidativo muscular. Peroxidação lipídica – TBARS (A); dano proteico – proteína carbonilada (B), representados pela média  $\pm$  erro padrão. SEX-DP: controle sem exercício; SEX-DH: obeso sem exercício; EXB-DP: controle exercício de baixa intensidade; EXB-DH:obeso exercício de baixa intensidade; EXM-DP: controle exercício de moderada intensidade; EXM-DH:obeso exercício de moderada intensidade. “a”  $p<0,05$ , diferente do EXM-DP; “c”  $p<0,05$ , diferente do SEX-DP.

**Figura 8.** Defesa antioxidante muscular



**Figura 8.** Defesa antioxidante muscular. Atividade da Catalase (A); Atividade anti-oxidante total - FRAP (B), representados pela média  $\pm$  erro padrão. SEX-DP: controle sem exercício; SEX-DH: obeso sem exercício; EXB-DP: controle exercício de baixa intensidade; EXB-DH:obeso exercício de baixa intensidade; EXM-DP: controle exercício de moderada intensidade; EXM-DH:obeso exercício de moderada intensidade. “a”  $p<0,05$ , diferente do EXM-DP; “c”  $p<0,05$ , diferente do SEX-DP.

**Tabela 1.** Composição (g) das dietas

Ingredientes	Dieta	Dieta
	Padrão (g)	Hiperlipídica (g)
Amido	467,5	115,5
Caseína	200,0	200,0
Amido de milho	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	-	312,0
Celulose microfibra (fibra)	50,0	50,0
Mistura de minerais	35,0	35,0
Mistura de vitaminas	10,0	10,0
L-cistina	3,0	3,0
Total	<b>1000</b>	<b>1000</b>

**Tabela 2.** Proporção calórica das dietas

	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica
Carboidrato	71%	26%
Proteína	20%	15%
Gordura Total	9%	59%
Calorias/g dieta	3,96	5,36

**Tabela 3.** Massa corporal e de tecidos

Parâmetro	SED-DP	SED-DH	ESC-DP	ESC-DH	EX-DP	EX-DH
Massa inicial (g)	27,31±0,47	27,65±0,34	27,04±0,58	27,12±0,67	27,68±0,34	27,50±0,67
Massa final (g)	43,45± 1,21	60,85± 4,76 <sup>a, b, c</sup>	40,98±0,79	54,52±4,81 <sup>a</sup>	38,48±0,84	54,06±2,54 <sup>a</sup>
Massa fígado (g)	1,99± 0,61	3,01± 0,87 <sup>a, b</sup>	1,80±0,09	2,46±0,91	1,61±0,03	2,58±0,47
Massa tecido	1,31± 0,24	3,19± 0,43 <sup>a, b, c</sup>	0,71±0,08	2,82±0,25 <sup>a, b, c</sup>	0,62±0,02	2,49±0,17 <sup>a, b, c</sup>
Adiposo (g)						

Os valores estão representados como média ± erro padrão. SEX-DP: controle sem exercício; SEX-DH: obeso sem exercício; EXB-DP: controle exercício de baixa intensidade; EXB-DH:obeso exercício de baixa intensidade; EXM-DP: controle exercício de moderada intensidade; EXM-DH:obeso exercício de moderada intensidade. “a” p<0,05, diferente do EXM-DP; “b” p<0,05, diferente do EXB-DP; “c” p<0,05, diferente do SEX-DP.

**Tabela 4.** Perfil lipídico fígado

Parâmetro	SED-DP	SED-DH	ESC-DP	ESC-DH	EX-DP	EX-DH
Lipídeos totais fígado (mg)	5,62± 0,48	18,77± 2,41 <sup>a, b, c</sup>	3,90±0,58	13,85±1,65 <sup>a, b, c</sup>	4,07±0,09	12,08±2,27 <sup>a,b,c,d</sup>
Colesterol fígado (mg/dL)	83,08± 17,21	52,98± 1,73	77,03±3,14	69,94±7,24	68,78±2,30	58,33±3,59
Triglicerídeos fígado (mg/dL)	160,60± 23,55	1455± 130,30 <sup>a, b, c</sup>	172,20±33,86	990,5±166,4 <sup>a,b,c</sup>	115,3±11,93	1103±253,9 <sup>a, b, c</sup>

Os valores estão representados como média ± erro padrão. SEX-DP: controle sem exercício; SEX-DH: obeso sem exercício; EXB-DP: controle exercício de baixa intensidade; EXB-DH:obeso exercício de baixa intensidade; EXM-DP: controle exercício de moderada intensidade; EXM-DH:obeso exercício de moderada intensidade. “a” p<0,05, diferente do EXM-DP; “b” p<0,05, diferente do EXB-DP; “c” p<0,05, diferente do SEX-DP, “d” p<0,05, diferente do SEX-DH.

# ANEXOS

## **ANEXO 1 – Parecer do comitê de ética e pesquisa**



## FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE ADENDO E/OU MUDANÇA EM PROJETO

**Título do Projeto:** Resposta astrocitária no hipotálamo de animais submetidos à dieta hiperlipídica e exercício aeróbico

Nº de registro na CEUA: 063/11

**Autor principal:** Renata Graciele Zanon

### A) Metodologia original descrita no projeto:

#### Material e método

O treinamento será realizado no CEBEA e os procedimentos para extração e processamento do cérebro serão realizados no laboratório de neurociência localizado no setor de anatomia humana (bloco 2A térreo). O corte do material congelado será realizado no laboratório de histologia no bloco 2B 1º andar.

Serão utilizados 30 camundongos Swiss machos estocados no biotério da Universidade Federal de Uberlândia (CEBEA), em condições de temperatura ( $22\pm1^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro/escuro de 12 em 12 horas, com livre acesso à dieta após o desmame (4 semanas) e água. Os animais serão pesados a partir do acesso à dieta e submetidos ao exercício aquático a partir da 7ª semana de vida. Os grupos serão divididos da seguinte maneira: 5 camundongos sedentários com dieta normal (DN = dieta normal), 5 sedentários com dieta rica em gordura saturada (DG = dieta "gorda"), 5 animais submetidos ao exercício físico aquático com DG e 5 animais submetidos ao exercício físico com DN, 5 animais submetidos ao ambiente aquático (placebo) com DN e 5 animais submetidos ao ambiente aquático com DG.

Ao realizarmos o treinamento físico, obedecemos um protocolo de atividade física aquática, onde será realizado em um tanque de vidro de altura de 300mm, 350mm de comprimento e 300mm de largura e com temperatura da água entre  $32\pm3^{\circ}\text{C}$ , a ser realizado 3 vezes por semana, durante 12 semanas, com tempo inicial de 15 minutos, progredindo de 5 em 5 minutos até atingir 60 minutos.(foi anexado um peso de 2,5% da massa corporal do camundongo, em sua cauda, afim de garantir a efetividade da natação).

Para induzir o ganho de massa corporal (obesidade), será utilizado o seguinte protocolo de dieta hiperlipídica, considerando valores aproximados de 1,4% de gordura saturada para dieta padrão e 10% para dieta rica em gordura saturada:

Ingredientes	Controle (g)	Hiperlipídica rica em saturados (g)
Amido	467,5	115,5
Caseína	200,0	200,0

Amido de Milho dextrinizado	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	-	312,0
Celulose microfibra (fibra)	50,0	50,0
Mistura de minerais	35,0	35,0
Mistura de vitaminas	10,0	10,0
L-cistina	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Total	1000,0	1000,0

Os animais serão submetidos à eutanásia através de overdose de anestésico (cetamina e xilazina, 1:1, 10ul/g). O animal será perfundido transcardiacamente com 20 ml de tampão fosfato (PB, 0,1M, pH 7,4, Nutricell, Brasil) e, posteriormente, fixado com 20 ml de solução fixadora de formaldeído 4% em PB 0,1M, pH 7,4. O cérebro dos animais será extraído e dissecado, emblocado e fatiado com espessura de 12 µm. As lâminas prontas, contendo os cortes histológicos de cérebro serão estocadas a -20°C até a realização da técnica de imunohistoquímica.

**B) Adendo ou modificação a ser executada na metodologia original:**

Por meio deste presente adendo venho solicitar 2 alterações:

- 1) Utilização de 30 animais para repetição dos experimentos.
- 2) O estudo de outros tecidos (descritos abaixo) retirados dos animais após eutanásia.

**C) Justificativa do autor para solicitação de adendo e/ou modificação no projeto:**

A primeira justificativa baseia-se no fato de que a variabilidade de resposta dos 30 animais, alocados em 6 grupos, foi muito diversificada. Diante disso, uma alternativa seria aumentarmos o número de indivíduos por grupo de 5 para 10. Outra questão é que conseguimos auxílio financeiro através de edital universal CNPq e nele constava outra técnica que não utilizaria tecidos fixados em formaldeído, necessitando, portanto de novos animais para a realização desse procedimento denominado western blotting. Dessa forma, aumentando mais 5 animais por grupo, atendemos a necessidade de aumento de n para diluirmos a heterogeneidade de respostas comportamentais ao exercício e atendemos a demanda da aplicação da dosagem de proteínas através de western blotting.

Sabendo-se que a obesidade é uma doença considerada epidemia mundial e que ainda não possui tratamento eficiente, aliado ao atual conhecimento de que a obesidade é vista como uma inflamação sistêmica, ou seja, afeta muitos tecidos do organismo, e ainda, considerando que os procedimentos desse projeto constituem experimentos longos, trabalhosos e caros (administração de dieta especial comprada durante 4 meses, treinamento diário durante 2 meses) após eutanásia dos animais, além do encéfalo, foram extraídos outros tecidos com o intuito de se estudar as resposta de todo o organismo desses animais frente à alimentação rica em gordura e prática de atividade física. Dessa forma, retirou-se rins, pulmões, músculos tibiais e gastrocnêmio bilaterais, fígado, sangue, gordura periepididimal, próstata, intestino e coração. Esse material está mantido congelado ou fixado para futuras análises que venho pedir permissão através desse adendo. Nesse sentido outros pesquisadores/docentes da UFFU estarão envolvidos com esses procedimentos conforme segue abaixo:

Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso (Setor de Histologia/ICBIM) utilizará tendões dos músculos recolhidos para análise histológica e dosagem de colágeno.

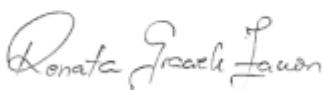
Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo (Setor de Ciências Fisiológica/ICBIM) utilizará o sangue para dosagem de citocinas e fará a morfologia do músculo tibial.

Profa. Dra. Francoise Botelho (Setor de Bioquímica/INGEB) realizará dosagens bioquímicas, perfil lipídico e histologia de fígado, dosagens bioquímicas da gordura, dos rins, pulmões e músculos tibiais, e ainda, histologia e imunoistoquímica do intestino.

Profa. Dra. Daniele Ribeiro Lisboa (Setor de Histologia/ICBIM) estudará as próstatas desses animais.

Prof. Dr. Alexandre Antonio Vieira (Setor de Ciências Fisiológica/ICBIM) realizará análise morfológica e verificação de uma possível hipertrofia do miocárdio.

**Data: 23/04/2014**



**Assinatura do autor principal**



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:[ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br);  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 035/14 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE  
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 063/11**

Projeto Pesquisa: "Resposta astrocitária no hipotálamo de animais submetidos  
à dieta hiperlipídica e exercício aeróbico".

Pesquisador Responsável: Renata Graciele Zanon

O adendo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com  
animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da  
pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

**SITUAÇÃO: ADENDO APROVADO.**

**OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO  
DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE  
ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

Uberlândia, 15 de maio de 2014

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU