

**UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE**

**ADAPTAÇÕES METABÓLICAS E DE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDAS PELO  
TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS  
OBESOS**

**VICTOR HUGO ANTONIO JOAQUIM**

**JOINVILLE – SC**

**2018**

**VICTOR HUGO ANTONIO JOAQUIM**

**ADAPTAÇÕES METABÓLICAS E DE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDAS PELO  
TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS  
OBESOS**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Delwing de Lima e Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Werlang Coelho.

**JOINVILLE – SC**

**2018**

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

J62a	<p>Joaquim, Victor Hugo Antonio</p> <p>Adaptações metabólicas e de estresse oxidativo induzidas pelo treinamento físico aeróbico em músculo esquelético de ratos obesos/ Victor Hugo Antonio Joaquim; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima; coorientadora Dra. Carla Werlang Coelho. – Joinville: UNIVILLE, 2018.</p> <p>61 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)</p> <p>1. Exercícios aeróbicos. 2. Obesidade. 3. Stress oxidativo. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Coelho, Carla Werlang (coorient.). III. Título.</p> <p>CDD 613.71</p>
------	---

Elaborada por Rafaela Ghacham Desiderato – CRB-14/1437

## Termo de Aprovação

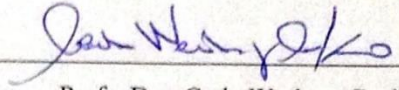
### “Adaptações Metabólicas e de Estresse Oxidativo Induzidas pelo Treinamento Físico Aeróbico em Músculo Esquelético de Ratos Obesos”

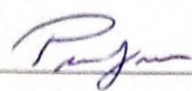
por

Victor Hugo Antônio Joaquim

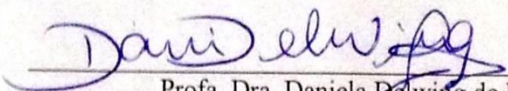
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

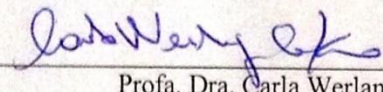
  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima  
Orientadora (UNIVILLE)

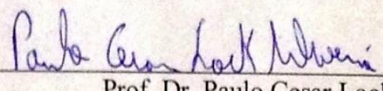
  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Carla Werlang Coelho  
Coorientadora (UNIVILLE)

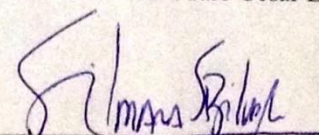
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

#### Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima  
Orientadora (UNIVILLE)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Carla Werlang Coelho  
Coorientadora (UNIVILLE)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira  
(UNESC)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Silmara Salette de Barros Silva Mastroeni  
(UNIVILLE)

Joinville, 23 de fevereiro de 2018

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à condução inigualável de minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniela Delwing de Lima e co-orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Werlang Coelho durante esse trabalho. O aprendizado, os momentos e as amizades eu certamente terei em minha memória para sempre.

Agradeço à minha namorada, Rhaiana Rizzi, pelo companheirismo e compreensão durante os períodos *full time* que o mestrado exigiu. À minha família, obrigado pela admiração e pelas felicitações mesmo sem compreender exatamente o que eu estava realizando. Paulo Jannig, sua disponibilidade via WhatsApp fez-me sentir como se fosse meu companheiro de laboratório. Obrigado por toda a ajuda!

Agradeço aos bons amigos que esse mestrado me trouxe. São pessoas maravilhosas e que levarei para sempre. Obrigado pelos questionamentos e críticas que certamente fizeram esse trabalho evoluir.

Aos docentes, um agradecimento especial. Cada aula contribuiu um pouco em meu crescimento enquanto acadêmico. Minha dívida com vocês é honrar o título de Mestre pelo qual estou batalhando.

Aos membros da banca, obrigado pelas considerações.

À UNIVILLE, agradeço pelo programa, pela estrutura, pela visão acadêmica e pelo apoio financeiro através do Fundo de Apoio a Pesquisa.

À todos que colaboraram de alguma forma para esse momento, meu muito obrigado.

**“A mente é como um paraquedas. Não funciona se não estiver aberta.”**

Frank Zappa

## RESUMO

**Introdução:** A obesidade tomou proporções pandêmicas, e a preocupação acerca desse tópico se deve ao impacto negativo que essa condição tem sobre a saúde humana. O exercício físico, por sua vez, se apresenta como um importante agente na prevenção, controle e tratamento da obesidade. Entretanto, esse tratamento não-medicamentoso pode ser realizado de diferentes maneiras, possibilitando diferenças em modalidade e estrutura de treinamento. **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi avaliar as adaptações metabólicas e de estresse oxidativo induzidas pelo treinamento físico aeróbico intervalado de alta intensidade e pelo contínuo de intensidade moderada no músculo esquelético de ratos obesos. **Materiais e Métodos:** 24 ratos *Wistar* machos foram distribuídos randomicamente para um grupo que recebeu dieta hiperlipídica (DHL) enquanto que o outro grupo recebeu dieta padrão (DNL), durante 8 semanas. Ao término da oitava semana, os animais do grupo DHL foram distribuídos em um grupo sedentário (DHL-SED, n=6), que não realizou treinamento físico; um grupo que treinou sob o protocolo de treinamento contínuo (DHL-TC, n=6) e outro grupo que realizou o treinamento intervalado de alta intensidade (DHL-HIIT, n=6). Essa configuração de dieta e treino se manteve por mais 8 semanas. **Resultados:** A DHL não aumentou significativamente a massa corporal total dos animais, porém, a quantidade de tecido adiposo intra-abdominal dos grupos DHL-SED e DHL-TC foi significativamente superior ao grupo DNL-SED (grupo controle), enquanto que o DHL-HIIT não apresentou diferença estatística, se assemelhando ao grupo controle. O grupo DHL-TC apresentou melhora nas três enzimas antioxidantes avaliadas (catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD e glutatona peroxidase - GSH-Px) e reduziu os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). O grupo DHL-HIIT elevou os níveis de CAT e SOD, reduziu o nível de TBA-RS, porém, aumentou a carbonilação das proteínas. Sobre os parâmetros de metabolismo energético, o grupo DHL-TC aumentou a atividade da citrato sintase (CS), succinato desidrogenase (SDH), citocromo c oxidase (COX) e complexo II, enquanto que o DHL-HIIT aumentou a atividade da piruvatoquinase (PK), CS e COX. **Conclusão:** Apesar de ambos os protocolos apresentarem efeitos similares relacionados ao estresse oxidativo e ao metabolismo energético, com algumas vantagens para cada método, o HIIT pode, então, ser classificado como uma estratégia eficiente para o combate aos efeitos deletérios da obesidade, utilizando menos tempo do praticante. **Palavras-chave:** Obesidade; Treinamento Físico Aeróbico; Estresse Oxidativo, Músculo Esquelético.

## ABSTRACT

**Introduction:** Current concerns about obesity are mainly due to its pandemic profile and its associated health risks. Physical exercise plays an important role in the prevention, control and treatment of this condition. However, this non-surgical and non-drug therapy can be performed in different types of modalities and employing different technical structures of training. **Objective:** This study aimed to evaluate the energy metabolism and oxidative stress adaptations induced by high intensity interval training versus moderate intensity continuous training in the skeletal muscle of obese rats. **Materials and Methods:** Adult male *Wistar* rats were randomly assigned into high-fat diet (HFD) or normal diet (ND), during 8 weeks. Upon completion of 8 weeks of the diet, animals from the HFD were randomly assigned to one untrained group (HFD-UNT) and two groups trained with different aerobic exercise training protocols, HFD-Moderate Intensity Continuous Training (MICT) and HFD-High-Intensity Interval Training (HIIT). Animals from the ND were assigned to one untrained group (ND-UNT). These four experimental groups underwent 8 more weeks of diet and training. **Results:** HFD did not induce a significant change in the animals' body mass, however, the HFD-UNT and HFD-MICT groups presented significantly higher amounts of intraabdominal adipose tissue. MICT increased catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and decreased thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS). The HIIT protocol increased CAT and SOD, decreased TBA-RS and increased the protein carbonylation. With regard to energy metabolism, MICT increased citrate synthase (CS), succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome c oxidase (COX) and complex II, while HIIT increased pyruvate kinase (PK), CS and COX, but did not up regulate SDH or complex II. **Conclusion:** In summary, both training protocols showed similar outcomes for oxidative stress and energy metabolism parameters, leading to the classification of HIIT as a time-efficient training protocol.

**Keywords:** Obesity; Aerobic Exercise Training; Oxidative Stress; Skeletal Muscle.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dismutação do radical superóxido em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e oxigênio .....	19
Figura 2 – Redução do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em oxigênio (O <sub>2</sub> ) e água .....	20
Figura 3 – Ciclo da glutathione .....	20
Figura 4 – Estresse oxidativo. Adaptado de Narasimhan and Rajasekaran (2015) .....	22
Figura 5 – Hidrólise da ATP .....	24
Figura 6 – Hidrólise da fosfocreatina .....	25
Figura 7 – Processo da glicólise .....	26
Figura 8 – Esquema do Ciclo do Ácido Cítrico .....	27
Figura 9 – Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons .....	28
Figura 10 – Diferenças entre atividade física e exercício físico.....	
Adaptado de Caspersen <i>et al</i> (1985) .....	30
Figura 11 – Tabela nutricional da DHL .....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b><math>^1\text{O}_2</math></b>	<b>Oxigênio <i>Singlet</i></b>
<b>CAT</b>	<b>Catalase</b>
<b>DHL</b>	<b>Dieta Hiperlipídica</b>
<b>DNL</b>	<b>Dieta Normolipídica</b>
<b>ERN</b>	<b>Espécies Reativas de Nitrogênio</b>
<b>ERO</b>	<b>Espécies Reativas de Oxigênio</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutationa</b>
<b>GSH-Px</b>	<b>Glutationa Peroxidase</b>
<b>GSH-Rd</b>	<b>Glutationa Redutase</b>
<b>GSSG</b>	<b>Glutationa Oxidada</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de Hidrogênio</b>
<b>HIIT</b>	<b><i>High-intensity Interval Training</i></b>
<b>HO<sub>2</sub>•</b>	<b>Radical Hidroperoxila</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido Nítrico</b>
<b>O<sub>2</sub>•<sup>-</sup></b>	<b>Radical Superóxido</b>
<b>OH•</b>	<b>Radical Hidroxila</b>
<b>ONOO•<sup>-</sup></b>	<b>Peroxinitrito</b>
<b>SED</b>	<b>Sedentário</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido Dismutase</b>
<b>TBA-RS</b>	<b>Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico</b>
<b>TC</b>	<b>Treinamento Contínuo</b>
<b>TFA</b>	<b>Treinamento Físico Aeróbico</b>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Obesidade e Sedentarismo .....</b>	<b>15</b>
2.1.1. Obesidade .....	15
2.1.2. Sedentarismo .....	16
<b>2.2. Radicais Livres .....</b>	<b>17</b>
2.2.1. História e Definições .....	17
<b>2.3. Agentes Antioxidantes .....</b>	<b>19</b>
2.3.1. Sistema de defesa antioxidante enzimática .....	19
2.3.2. Sistema de defesa antioxidante não-enzimática .....	20
<b>2.4. Estresse Oxidativo .....</b>	<b>21</b>
2.4.1. Dano Lipídico .....	22
2.4.2. Dano Proteico .....	23
2.4.3. Dano ao DNA .....	23
<b>2.5. Metabolismo Energético .....</b>	<b>24</b>
2.5.1. Sistema ATP-CP (creatinafosfato ou fosfocreatina) .....	24
2.5.2. Glicólise (alática e láctica) .....	25
2.5.3. Produção Aeróbica de ATP .....	26
2.5.3.1. Ciclo do Ácido Cítrico (Ciclo de Krebs) .....	26
2.5.3.2. Cadeia Respiratória (cadeia transportadora de elétrons) .....	27
2.5.4. O <i>Continuum</i> da Bioenergética .....	28
2.5.5. Obesidade e Metabolismo Energético .....	29
<b>2.6. Exercício Físico .....</b>	<b>29</b>
2.6.1. Exercício Físico e Radicais Livres .....	30

2.6.2. Exercício Aeróbico Intervalado vs Contínuo .....	31
<b>3. INTERDISCIPLINARIDADE .....</b>	<b>33</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. Animais .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Protocolo Experimental .....</b>	<b>34</b>
4.2.1. Indução dietética da obesidade .....	34
4.2.2. Protocolos de Treinamento Aeróbico .....	35
<b>4.3. Preparação dos Tecidos .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4. Protocolos de Análises .....</b>	<b>36</b>
4.4.1. Análise dos Parâmetros de Estresse Oxidativo .....	36
4.4.1.1. Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS) .....	36
4.4.1.2. Proteínas Carboniladas .....	37
4.4.1.3. Conteúdo Total de Sulfidrilas .....	37
4.4.1.4. Catalase .....	37
4.4.1.5. Glutationa Peroxidase .....	38
4.4.1.6. Superóxido Dismutase .....	38
4.4.2. Análise dos Parâmetros do Metabolismo Energético Aeróbico e Anaeróbico .....	38
4.4.2.1. Citrato Sintase .....	38
4.4.2.2. Atividades do Complexo II e Succinato Desidrogenase .....	38
4.4.2.3. Atividade da Citocromo c Oxidase .....	39
4.4.2.4. Atividade da Piruvatoquinase .....	39
4.4.3. Dosagem de Proteínas .....	39
<b>4.5 Análise Estatística .....</b>	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a condição de sobrepeso e obesidade não é novidade no meio científico, porém, nos últimos anos vem ganhando atenção especial devido as proporções pandêmicas que já atingiu. Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014), nos últimos 34 anos a prevalência de obesidade entre adultos quase dobrou, caracterizando um grande problema de saúde pública, uma vez que seus efeitos deletérios no organismo afetam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003). Efeitos prejudiciais dessa condição são observados em praticamente todos os sistemas fisiológicos do organismo. O sistema cardiovascular é afetado de forma estrutural e funcional, tornando a obesidade um fator de risco independente para doenças cardiovasculares (Framingham Heart Study, HUBERT *et al.*, 1983). Átrio e ventrículo esquerdo sofrem, respectivamente, alargamento e hipertrofia, induzindo a disfunção diastólica (SON *et al.*, 2016). Esse remodelamento gera disfunções como insuficiência cardíaca e disfunções miocárdicas (WONG; MARWICK, 2007).

O modo como o organismo gera energia para seus sistemas também é influenciado. O metabolismo dos carboidratos, por exemplo, é prejudicado devido alterações na glicogenólise e gliconeogênese hepática e muscular (CEPERUELO-MALLAFRÉ *et al.*, 2016; JENSEN *et al.*, 2011). Ainda que por mecanismos não totalmente compreendidos, existem evidências que suportam uma correlação negativa entre obesidade, conteúdo e função mitocondrial (CHRISTE *et al.*, 2013; THYFAULT *et al.*, 2004), levando a prejuízos na capacidade oxidativa das células. A obesidade também está intimamente associada a gênese de inflamação, devido a modulação positiva em adipocinas como a Interleucina 6 (IL-6) (SINDHU *et al.*, 2015), a proteína C reativa (CHOI; JOSEPH; PILOTE, 2013) e o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993); esses mediadores inflamatórios em níveis elevados no organismo induzem à condição de estresse oxidativo (HUANG *et al.*, 2015) que, por sua vez, causa danos fisiológicos (QATANANI; LAZAR, 2007).

Existem várias pesquisas relacionadas a obesidade, com intuito de entender, prevenir e até mesmo reduzir o tecido adiposo excessivo, muitas delas com base no uso de fármacos e intervenções médicas invasivas, e outras não-medicamentosa, como o exercício físico e reeducação alimentar, com efeitos colaterais praticamente desconsideráveis.

Nas duas últimas décadas, estudos foram realizados a fim de testar modelos de treinamento físico, com diferenças estruturais, como frequência, duração, intensidade, volume e mesmo comparando exercícios aeróbicos, contra resistência e mistos (DE FEO, 2013) com objetivo de gerar posicionamentos em relação ao treinamento físico e controle do peso corporal (JAKICIC *et al.*, 2001).

Se faz necessário testar e experimentar condições muito específicas para que se possa gerar conhecimento suficiente para abranger de fato toda essa problemática e encará-la com ferramentas eficientes e seguras.

## **1.1 Objetivo geral**

Avaliar as adaptações metabólicas e de estresse oxidativo induzidas pelo treinamento físico aeróbico intervalado de alta intensidade e pelo contínuo de intensidade moderada no músculo esquelético de ratos obesos.

## **1.2 Objetivos específicos**

- 1) Verificar os efeitos da DHL sobre a massa corporal total e o tecido adiposo intra-abdominal;
- 2) Verificar os efeitos da DHL sobre os parâmetros de estresse oxidativo, defesa antioxidante e metabolismo energético do músculo gastrocnêmio;
- 3) Avaliar os efeitos do Protocolo de Treinamento Físico Aeróbico (TFA) intervalado de alta intensidade (HIIT) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas, proteínas carboniladas (PC), a atividade das enzimas antioxidantes (catalase - CAT, superóxido Dismutase - SOD e glutathiona peroxidase - GSH-Px) e a atividade das enzimas citrato sintase, complexo II e succinato desidrogenase, citocromo c oxidase e piruvato quinase, no músculo gastrocnêmio;
- 4) Avaliar os efeitos do Protocolo de TFA contínuo de intensidade moderada (TC) sobre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas, proteínas carboniladas (PC), a atividade das enzimas antioxidantes (catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD e glutathiona peroxidase - GSH-Px) e a atividade das enzimas citrato sintase, complexo II e succinato desidrogenase, citocromo c oxidase e piruvato quinase, no músculo gastrocnêmio.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Obesidade e sedentarismo

#### 2.1.1 Obesidade

Esse termo é utilizado para designar o indivíduo que possui um acúmulo excessivo e desproporcional de tecido adiposo e que geralmente é acompanhado de inflamação crônica e sistêmica (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017). Ainda hoje o índice de massa corporal (IMC) é o critério de classificação mais utilizado e indivíduos com IMC igual ou acima de 30 kg/m<sup>2</sup> são considerados obesos (WHO, 2014). A obesidade está intimamente associada a patologias como doença arterial coronariana (DAC), alguns tipos de câncer, diabetes mellitus tipo 2 e outras doenças cardiovasculares (JUNG, 1997; KAHN; FLIER, 2000). A preocupação com essa situação deve-se ao fato de a obesidade ter tomado proporções pandêmicas, se tornando um grande problema de saúde pública, uma vez que seus efeitos deletérios no organismo afetam diretamente a qualidade de vida (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCH JR., 2003). Em 2010, cerca de 3,4 milhões de mortes em todo o mundo foram associados ao sobrepeso e obesidade (WHO, 2014), colocando a obesidade no *hall* dos maiores fatores de riscos em mortalidade, responsável por aproximadamente 5% das mortes em escala global (WHO, 2009).

De acordo com os estudos de Kelley *et al* (1999) e Thyfault *et al* (2004), indivíduos obesos apresentam maior acúmulo de triglicerídeos intramusculares (IMTG), suportando a ideia de que isso se deve a diminuição do transporte dos ácidos graxos para dentro da mitocôndria, e essa redução, por sua vez, refletiria em diminuição do conteúdo mitocondrial. Christie *et al* (2013) compararam a atividade da enzima Citrato Sintase (CS) (catalisadora da primeira reação do Ciclo do Ácido Cítrico) de 90 pacientes obesos com 45 considerados não-obesos e constatou que a quantidade da enzima não mostrou nenhuma associação com idade, gênero ou diabetes mellitus tipo 2 ( $p > 0,145$ ), porém, encontrou associação com a obesidade ( $p < 0,005$ ), concluindo que a obesidade gerou redução na ação (e expressão proteica) da CS e, conseqüentemente, na capacidade oxidativa mitocondrial. Apesar de alguns autores defenderem esse mecanismo, o mesmo ainda não está totalmente elucidado, uma vez que outros estudos apontam que a capacidade oxidativa e o conteúdo mitocondrial não foram alterados em humanos obesos (FISHER-WELLMAN *et al.*, 2014).

Estudos também apontam efeitos prejudiciais da obesidade no metabolismo dos carboidratos. Nos mamíferos, a glicose é armazenada em forma de glicogênio (hepático e muscular) para ser utilizada em momentos de déficit energético (CEPERUELO-MALLAFRÉ *et al.*, 2016). O glicogênio hepático tem como principal função manter a glicemia, regulando a quantidade de glicose que é disponibilizada para a corrente sanguínea. Já o glicogênio muscular não é capaz de inferir diretamente

na glicemia, por conta de seu metabolismo que o mantém no músculo para ser utilizado quando há necessidade de maior produção de energia, porém, pode ser reduzido à lactato (por fermentação anaeróbica) e transportado para o fígado, por meio do Ciclo de Cori (Cori 1928). Velho *et al* (1996) e Beck-Nielsen (2012) encontraram, em seus estudos, diminuição nos níveis de glicogênio hepático e muscular em indivíduos com patologias relacionadas à obesidade, como resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2, sugerindo estresse metabólico. Lu *et al* (2014), por outro lado, demonstraram aumentar o estoque de glicogênio hepático em ratos alimentados com dieta hiperlipídica e associaram essa resposta fisiológica a um aumento na expressão da *Protein Targeting to Glycogen (PTG)*. Esse mecanismo ainda está sob investigação, mas é consenso que a composição da dieta influencia diretamente no metabolismo do glicogênio, e que tais alterações podem induzir a doenças.

Mas talvez o efeito mais nocivo da obesidade seja a sua capacidade de disparar um quadro inflamatório generalizado. Hoje se sabe que o tecido adiposo não se resume a um estoque de triglicérides, mas sim uma glândula endócrina que secreta suas próprias citocinas (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007; KERSHAW; FIER, 2004), como a IL-6, o TNF- $\alpha$  e a proteína C reativa, consideradas exemplos de biomarcadores inflamatórios. Uma vez que seus níveis basais estão elevados, um quadro de inflamação é iniciado, e a partir daí inúmeras patologias são desenvolvidas. Todas estas adipocinas citadas estão aumentadas na condição de obesidade (CHOI; JOSEPH; PILOTE, 2013; HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; SINDHU *et al.*, 2015).

### 2.1.2 Sedentarismo

Mesmo com o esforço de instituições como a Organização Mundial da Saúde (OMS), Colégio Americano de Medicina Esportiva (ACSM) e Colégio Europeu de Ciências do Esporte (ECSS) para a conscientização da importância da atividade física na manutenção da saúde, as estatísticas ainda não são nada positivas. O relatório global de doenças não-comunicáveis publicado em 2010 pela OMS mostrou que, em 2008, 28% dos homens e 34% das mulheres acima dos 15 anos era considerado insuficientemente ativo (não alcançava a pontuação mínima no *Global Physical Activity Questionnaire – GPAQ*). Mais especificamente, na região das Américas a prevalência de fisicamente inativos alcançou quase 50% das mulheres e 40% dos homens (WHO, 2010). Já no último relatório da OMS sobre os fatores de risco para doenças não-comunicáveis, a inatividade física ocupou a quarta posição no *podium*, com 6% das mortes a nível mundial, uma posição acima do tópico abordado anteriormente – obesidade – que ficou com a quinta posição e responsável por 5% das mortes (WHO, 2009). Essa relação de sedentarismo – doença já é conhecida há algum tempo, porém foi no início desse século que os estudos acerca do impacto da inatividade física na saúde humana realmente



tomaram corpo e prosperaram. Por conta dessa informação, hoje sabemos que o comportamento sedentário está intimamente associado a diversas condições patológicas, como doenças cardiovasculares (LI; SIEGRIST, 2012), acidente vascular encefálico (AVE) (Willey *et al* 2016), síndrome metabólica (Honda *et al* 2016), doença renal crônica (Zelle *et al* 2017), entre outras. Mas a situação fica ainda mais preocupante ao se perceber que quando obesidade e sedentarismo coexistem em uma população, esse complexo tem potencial para alcançar todas as maiores causas de mortes, com exceção apenas do tabaco (segundo colocado, com 9% das mortes), uma vez que ambos são fortes fatores de risco para hipertensão arterial (maior causa de mortes – 13%) e glicemia sérica elevada (6% das causas de morte). Segundo o 1º Almanaque da Atividade Física, 9% das mortes a nível global estão relacionadas a inatividade física. No Brasil esse percentual aumenta para 13,2% (INTERNATIONAL SOCIETY FOR PHYSICAL ACTIVITY AND HEALTH, 2016).

## 2.2 Radicais livres

### 2.2.1 História e definições

Por definição, radicais livres são partículas com um ou mais elétrons não-pareados na última órbita atômica, e essa condição é responsável por uma de suas maiores características: a instabilidade (LUSHCHAK, 2012, p. 3). Segundo a Teoria do Octeto, proposta por Gilbert Lewis (1916), com exceção dos gases nobres, todos os átomos buscam emparelhar sua última camada eletrônica a fim de obter estabilidade. Quando essa estabilidade não é alcançada, esse átomo se torna altamente reativo.

Devido a essa instabilidade acreditava-se que não era possível a existência dessas partículas em sistemas biológicos, uma vez que sua vida era muito curta, não interferindo em quaisquer processos celulares e tampouco a própria estrutura celular. Entretanto, em 1954 um estudo publicado na *Nature* (nº 4432) descreveu uma descoberta que mudaria esse pensamento: “*Radicais livres em materiais biológicos*” foi o título escolhido para apresentar à comunidade científica esse novo olhar acerca dessas moléculas. Após melhorias nos métodos de análise, se percebeu que tecidos vivos continham sim porções desses radicais (COMMONER *et al* 1954). Desse momento em diante um novo ramo de pesquisa foi iniciado. Dois anos após a publicação supracitada, *Denham Harman* publica a sua hipótese do envelhecimento com base nos conhecimentos disponíveis à época sobre os radicais livres, que mais tarde viria a se tornar a Teoria do Envelhecimento via Radicais Livres (HARMAN, 1983). Nesse momento a ideia de que os radicais livres estariam associados à gênese de várias patologias, via dano celular, já era bem aceita e compreendida.

Os radicais livres resultam de reações de oxirredução (reações REDOX), onde ocorre doação ou ganho de elétrons (a fim de alcançar a estabilidade), são produzidos normalmente por organismos vivos e, em concentrações adequadas, são essenciais para a fisiologia dos mesmos (MAGDER, 2006) ou ainda pela autooxidação de componentes endógenos e exógenos (xenobióticos) (LUSHCHAK, 2012). Considerando que os radicais livres são, na realidade, apenas um grupo dentre as moléculas reativas, se faz necessário utilizar os termos Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), que podem ser radicalares (com a última camada eletrônica desemparelhada – radicais livres) ou não-radicalares (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

Entre as principais EROs podemos citar (BARREIROS *et al* 2006; FERREIRA E MATSUBARA, 1997; KEHRER E KLOTZ, 2015):

- Radical Superóxido ( $O_2^-$ ) – formado após a primeira redução do  $O_2$ , portanto, ocorre em praticamente todas as células aeróbicas;
- Radical hidroperoxila ( $HO_2^\bullet$ ) – é o superóxido com um próton de hidrogênio acoplado. Possui grande facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas;
- Radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) - considerada a mais reativa em sistemas biológicos, reagindo com bases do DNA, diversas proteínas e membranas lipídicas).

E representando as EROs não-radicalares, podemos citar:

- Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) – apesar de não ser radicalar, é considerado uma espécie altamente deletéria, pois participa da reação que produz o  $OH^\bullet$ ;
- Oxigênio *Singlet* ( $^1O_2$ ) – é a forma mais nociva do oxigênio no organismo, encontra-se em estado excitado, de maior energia do que o oxigênio no estado fundamental, e é a causa ou intermediário da toxicidade fotoinduzida do  $O_2$  em seres vivos.

Essas moléculas em questão são produzidas naturalmente no organismo e são, de fato, essenciais para alguns sistemas. Estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS *et al* 2006). São conhecidos alguns locais de produção celular dessas espécies, como os peroxissomos, lisossomos, retículo endoplasmático liso e a membrana plasmática, mas, em condições normais, a mitocôndria é a maior fonte geradora de EROs, devido à cadeia transportadora de elétrons. A maioria dos estudos envolvendo a produção mitocondrial de EROs utilizam sistemas artificiais, (*in vitro*), utilizando mitocôndrias isoladas e succinato como único substrato a ser reduzido (KEHRER; KLOTZ, 2015) e estimam que de 1% a 3% do consumo total de oxigênio na mitocôndria acaba se tornando uma ERO (Boveris *et al* 1972; Turrens 2003). Uma outra linha sugere que essa produção é bem menor (cerca de 0,15% do consumo total de oxigênio) (ST-PIERRE *et al.*, 2002).

Em relação aos principais ERNs, podemos citar (Adams *et al* 2015; Kehrer and Klotz 2015):

- Óxido Nítrico (NO) – radical envolvido no processo de vasodilatação e regulação vascular, fundamental para a plasticidade sináptica, aprendizado e memória, porém sua produção desregulada é associada a um grande número de doenças e efeitos deletérios ao organismo;
- Peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) – ERN não-radicalar formado a partir da reação do óxido nítrico com o superóxido, é um forte oxidante e, além de sua toxicidade direta, ele pode ser decomposto em outras moléculas nocivas, como o radical hidroxila.

São conhecidas hoje 11 ERNs, sendo duas radicalares (óxido nítrico e dióxido de nitrogênio) e o restante não-radicalar.

### 2.3 Agentes antioxidantes

A geração de EROs é regulada por um sistema de defesa altamente eficaz, responsável por (1) manter essa produção a níveis fisiológicos (a fim de evitar lesões celulares) bem como devido a (2) função reparadora, recuperando as células lesadas. A primeira linha de ação é composta pelas moléculas glutathiona reduzida (GSH),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), e pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). A segunda linha é composta pelo ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona-redutase (GSH-Rd) e, novamente, pela GSH-Px. Esses agentes são produzidos endogenamente ou adquiridos pela dieta (vitaminas C e E) e esse mecanismo regulador recebe o nome de sistema de defesa antioxidante, podendo ser classificado em defesa enzimática e não-enzimática (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

#### 2.3.1 Sistema de defesa antioxidante enzimática

São conhecidos três sistemas antioxidantes de origem enzimática. O primeiro é composto pela enzima SOD (que pode ser SOD-zinco-cobre, presente principalmente no citosol ou SOD-manganês, presente na mitocôndria) e é responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigênio, na presença do próton H<sup>+</sup> (Barreiros *et al* 2006; Ferreira and Matsubara 1997) (Fig.1). A participação da SOD mitocondrial (SOD-Mn) no sistema de defesa antioxidante é tão crucial para a sobrevivência celular que é letal quando ausente (Lebovitz *et al* 1996).



Fig. 1 – Dismutação do radical superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigênio mediado pela enzima SOD.

O segundo sistema de defesa enzimático é mais simples, formado pela CAT, uma hemoproteína citosólica responsável por degradar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerado na reação anterior, em oxigênio e água (Barreiros *et al* 2006) (Fig. 2).



Fig. 2 – Redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em oxigênio (O<sub>2</sub>) e água, mediada pela enzima CAT.

O terceiro sistema também promove a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em oxigênio e água, mas necessita do cofator glutathiona, um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) que existe no organismo em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (MEISTER; ANDERSON, 1983) e atua em ciclo alternando entre suas duas formas (reduzida e oxidada) com auxílio das enzimas Glutathiona Peroxidase (GSH-Px) que (na presença de selênio) oxida a GSH em GSSG enquanto transforma o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água, e a Glutathiona Redutase (GSH-Rd), que utiliza elétrons provenientes do Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) formado na via pentose-fosfato, e regenera a GSSG em GSH para reiniciar o ciclo (Barreiros *et al* 2006; Meister and Anderson 1983) (Fig. 3).

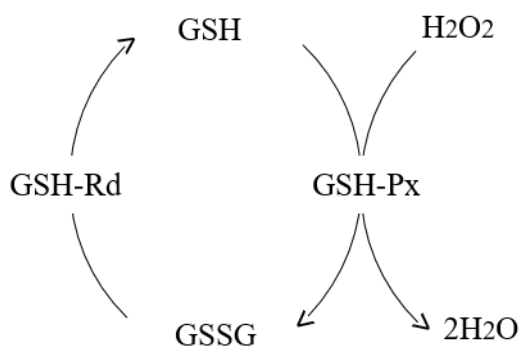


Fig. 3 – Ciclo da glutathiona alternando entre sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

### 2.3.2 Sistema de defesa antioxidante não-enzimática

É formado por compostos sintetizados endogenamente, como a bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q (CoQ) e ácido úrico, conhecidos como antioxidantes biológicos de baixo peso molecular, e outros adquiridos pela dieta como o ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol (vitaminas C – hidrossolúvel, e vitamina E – lipossolúvel, respectivamente) que, juntamente

com os flavonoides, são considerados os principais agentes antioxidantes não-enzimáticos, além do  $\beta$ -caroteno, que é o precursor da vitamina A (SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004).

Esses compostos atuam no organismo doando hidrogênio e elétrons, reduzindo metais de transição, desativando o oxigênio *singlet*, sequestrando os  $\text{HO}_2^\bullet$ , regenerando cofatores envolvidos nas reações REDOX e interagindo diretamente com as membranas, protegendo, dessa forma, os danos gerados pelos radicais livres nos lipídeos, proteínas e DNA (Barreiro *et al* 2006; Kehrer and Klotz 2015).

## 2.4 Estresse oxidativo

A geração de espécies reativas é um mecanismo fisiológico produzido naturalmente pelo metabolismo do oxigênio e que atua no organismo regulando e sinalizando algumas condições celulares (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006), mas, quando produzidos de forma descontrolada podem induzir a diversos danos celulares em lipídios, proteínas (e pequenos peptídeos), carboidratos, DNA e RNA (KEHRER; KLOTZ, 2015). Como uma solução evolutiva, várias moléculas (agentes antioxidantes), se especializaram em confrontar essas espécies reativas a fim de estabilizá-las e controlar seus efeitos deletérios, e existe, de fato, uma proporção entre esses dois agentes, uma taxa que mantém o sistema sob controle, sustentando a homeostasia (ou estado redox). Porém, por diversos motivos, essa proporção pode ser alterada, de forma que o equilíbrio se perde, e um quadro patológico se instala. Quando o cenário celular apresenta proporção agentes antioxidantes > agentes oxidantes, é chamado estresse reductivo, e possui diversos efeitos deletérios (BREWER *et al.*, 2013), enquanto que a configuração inversa (agentes antioxidantes < agentes oxidantes) caracteriza o, tão prejudicial quanto, estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2012, p. 4) (Fig. 4).

Esse cenário deletério é alcançado quando ocorre superprodução de EROs (e ERNs) seja por fatores externos (físicos e químicos) e internos. Temperatura, luz e irradiação constituem os fatores físicos e em relação ao fator químico trata-se de qualquer substância de várias naturezas (alimento, fumaça, químico transdérmico etc.) que ao adentrar o organismo estimula a produção desses agentes oxidantes. Pela outra via, a depleção do sistema antioxidante pode também promover esse desbalanço (LUSHCHAK, 2012).

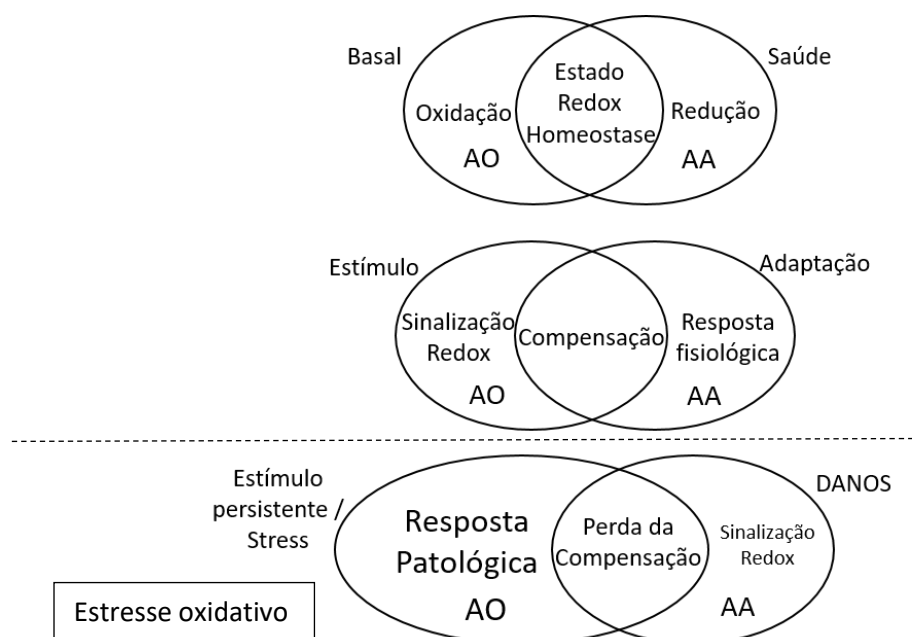


Fig. 4 – **AO** – Agentes Oxidantes; **AA** – Agentes Antioxidantes. Quadro patológico instalado configurando estresse oxidativo. Adaptado de Narasimhan and Rajasekaran (2015).

A preocupação acerca desses desequilíbrios no estado redox se dá porque pouco tempo depois da publicação que apresentava ao mundo que existiam, de fato, agentes oxidantes (radicais livres) em tecidos biológicos, linhas de pesquisa já começavam a encontrar relações estreitas entre níveis alterados dessas moléculas e doenças. Desde então cada vez mais condições patológicas vêm sendo estudadas a fim de compreender esse mecanismo. Hoje já se sabe que o estresse oxidativo está relacionado a doenças inflamatórias (HO *et al.*, 2015), cardiovasculares (KAYAMA *et al.*, 2015), câncer (TOYOKUNI, 2016), obesidade (KEANEY *et al.*, 2003), entre outras, e é por conta disso que são elaboradas estratégias para normalizar essa balança, evitando que um lado se sobressaia, promovendo a harmonia entre esses dois sistemas.

#### 2.4.1 Dano Lipídico

Os lipídios são alvos constantes dos ataques dos radicais livres, e foram extensamente estudados por conta de seu importante papel estrutural e funcional na membrana celular (KEHRER; KLOTZ, 2015). As duas principais EROS com capacidade de afetar esses lipídios de membrana são o  $\text{OH}\cdot$  e o  $\text{HO}_2\cdot$ . Enquanto o  $\text{OH}\cdot$  deve sua toxicidade a sua não-especificidade de ataque a biomoléculas, o  $\text{HO}_2\cdot$  desempenha um papel fundamental na peroxidação lipídica (lipoperoxidação), processo pelo qual ácidos graxos poli-insaturados, glicolipídios, fosfolipídios e colesterol são oxidados podendo

levar à morte celular (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). A estrutura da membrana bem como sua permeabilidade são alteradas, levando à perda da seletividade na troca iônica. Outra alteração importante é a formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído, que é utilizado como biomarcador) que, em excesso, têm potencial lesivo.

A lipoperoxidação é associada a mecanismos de envelhecimento, câncer e a exacerbação da toxicidade de xenobióticos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

#### 2.4.2 Dano Proteico

Aminoácidos e proteínas sofrem a ação dos agentes oxidantes (principalmente do OH•) podendo reagir na cadeia lateral, atacando preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina e, eventualmente, arginina e asparagina (BERGER; LEITNER; DORE, 1998). Esses danos podem induzir a perda de atividade enzimática, falhas no transporte ativo intracelular, citólise e morte celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A oxidação dessa estrutura pode levar a perda de grupos sulfidrilas além de induzir a geração de aldeídos ou cetonas (carbonilas) e hidroperóxidos (KEHRER; KLOTZ, 2015).

De maneira geral, aumento na oxidação de proteínas pode estar associado a perda de funções fisiológicas e bioquímicas relacionadas a fatores de envelhecimento, bem como interferir em outras macromoléculas como o DNA (BARAIBAR *et al.*, 2012).

#### 2.4.3 Dano ao DNA

A interação das EROs com o DNA pode afetar tanto a estrutura quanto a regulação de determinados genes (KEHRER; KLOTZ, 2015) e o ataque ocorre nas bases nitrogenadas assim como no açúcar (desoxirribose), este último quase sempre levando à ruptura da cadeia de DNA (HALLIWELL, 1999).

A principal preocupação ao dano gerado pelo estresse oxidativo ao DNA deve-se ao fato de que ao romper uma fita de DNA, a mesma pode se reconectar de maneira incorreta, levando a pequenos erros estruturais, constituindo o princípio básico da mutação. Conforme esses erros são acumulados aumenta-se a chance de desencadear a oncogênese (câncer) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

## 2.5 Metabolismo energético

Metabolismo é como se define a totalidade de reações químicas que acontecem em um organismo, sintetizando (anabolismo) e degradando (catabolismo) moléculas, nas mais variadas vias metabólicas, e convergindo para um único objetivo: a sobrevivência. Como todas as células necessitam de energia para sobreviver, mecanismos metabólicos foram se desenvolvendo para que estas conseguissem converter macronutrientes da alimentação (carboidratos, gorduras e proteínas) em energia biologicamente utilizável. A esse processo denomina-se bioenergética (POWERS; HOWLEY, 2005, p. 23). A energia liberada na degradação desses macronutrientes serve para fosforilar (agrupar uma molécula de fósforo) ao ADP (*adenosine diphosphato* – difosfato de adenosina), convertendo-o em ATP (*adenosine trifosfato* – trifosfato de adenosina), um composto de alta energia que é a principal moeda de troca dos sistemas biológicos, utilizado pelas células para gerar a energia necessária para suas funções (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2002). A utilização dessa energia pelas células se dá pela hidrólise do ATP (via ação da enzima ATPase), convertendo a ATP em ADP + fósforo inorgânico (Pi) + energia (Fig. 5)



Fig. 5 – Hidrólise da ATP para geração de energia biologicamente utilizável. **ATP** – Adenosina trifosfato; **ADP** – Adenosina difosfato; **Pi** – Fósforo inorgânico.

Todas as células do organismo fazem a hidrólise da ATP para geração de energia e todas as células possuem três vias metabólicas (bioenergéticas) para converter a energia dos macronutrientes para ser utilizada na refosforilação da ADP em ATP (POWERS; HOWLEY, 2005, p. 23). As células musculares, chamadas de fibras musculares, são responsáveis pelo movimento e são acionadas a todo momento; porém, elas possuem uma quantidade muito limitada de ATP disponível, fazendo-se necessário a ativação das vias bioenergéticas para sintetizar essa molécula energética (POWERS; HOWLEY, 2005, p. 23). A ATP pode ser sintetizado (e ressintetizado) de três principais maneiras, cada uma caracterizando o que se chama de sistema energético, utilizando diferentes mecanismos e substratos para seu gerenciamento, em repouso e em diferentes intensidades de atividade física.

### 2.5.1 Sistema ATP-CP (creatinafosfato ou fosfocreatina)

A fosfocreatina foi descoberta em 1927 no tecido muscular (FISKE, 1927). Mais de três décadas depois um estudo mostrou que a enzima que transformava a fosfocreatina em creatina (creatinaquinase), extraindo a molécula de fósforo, foi isolada, e percebeu-se que o nível de ATP rapidamente



diminuía, de forma que a contração muscular não mais poderia ser suportada (CAIN; DAVIES, 1962). Hoje se sabe que esse mecanismo é a maneira mais simples e rápida de providenciar ATP para a utilização celular.

Resumidamente, o que acontece é que a fosfocreatina doa, via hidrólise catalisada pela enzima creatina-quinase, um grupo fosfato para a ADP, transformando-o em ATP e se tornando uma molécula de creatina (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2002, p. 98; POWERS; HOWLEY, 2005, p. 30), sem a participação do oxigênio (sistema anaeróbico) (Fig. 6)

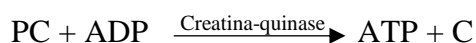


Fig. 6 – Hidrólise da fosfocreatina para geração de ATP. **PC** – Fosfocreatina; **ADP** – Adenosina Difosfato; **ATP** – Adenosina trifosfato; **C** – Creatina.

Apesar de ser uma via rápida e eficiente de ressintetização de ATP, a ATP-CP é limitada pela velocidade da enzima creatina-quinase, a qual regula o ritmo de fracionamento dessas moléculas energéticas. Esse sistema é responsável por gerar energia de forma rápida e explosiva e é essencial em esportes como corrida de 100 metros rasos, lançamentos e arremessos diversos, levantamentos de peso e quaisquer esportes de campo que demandam “tiros” de corrida. Porém, a ação desse sistema dificilmente durará mais que alguns segundos (entre 5’’ e 8’’) (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2002, p. 123). Para que a contração muscular continue é preciso utilizar, também, os outros sistemas energéticos.

### 2.5.2 Glicólise (alática e láctica)

A glicólise é a degradação da molécula de glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), que pode provir do glicogênio muscular – tópico abordado posteriormente, a fim de utilizar a energia das ligações dessa molécula para unir o Pi à ADP. As reações dessa fase acontecem no meio aquoso da célula, no sarcoplasma (citoplasma da célula muscular) e resultam na produção direta, mas reduzida, de ATP (saldo final de 2 moléculas de ATP), dois pares de hidrogênio que são sequestrados pela molécula transportadora NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) para serem levados para a mitocôndria, além de duas moléculas de ácido pirúvico (piruvato), contento três moléculas de carbono cada. Na ausência de  $\text{O}_2$  a glicólise é capaz de gerar energia (ATP), configurando a via anaeróbica, em que o piruvato formado sofre ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) é reduzido em ácido láctico (glicólise láctica), que não é aceito pela mitocôndria e por isso é direcionado ao fígado para ser reciclado pelo ciclo de Cori (Lactato muscular  $\rightarrow$  sangue  $\rightarrow$  fígado  $\rightarrow$  glicose  $\rightarrow$  sangue  $\rightarrow$  músculo). Na presença de  $\text{O}_2$  o

piruvato não sofre ação da LDH e segue para a matriz mitocondrial para gerar energia aerobicamente (glicólise alática ou aeróbica). Dessa forma a glicólise pode ocorrer tanto na forma anaeróbica quanto aeróbica (Fig. 7).

Mesmo com uma produção de energia muito baixa (apenas 5% do ATP total gerado pela degradação completa da molécula de glicose), ela conta com uma alta concentração de enzimas glicolíticas e com muita velocidade de reação, dessa forma o músculo conta com uma produção rápida e significativa de energia para continuar sua contração máxima, perdurando por até 90 segundos. Corrida de intensidade máxima de até 200 metros, natação de 100 m e provas de ginástica são exemplos de esportes que se beneficiam desse sistema (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2002, p. 102, 104; POWERS; HOWLEY, 2005, p. 32, 33).

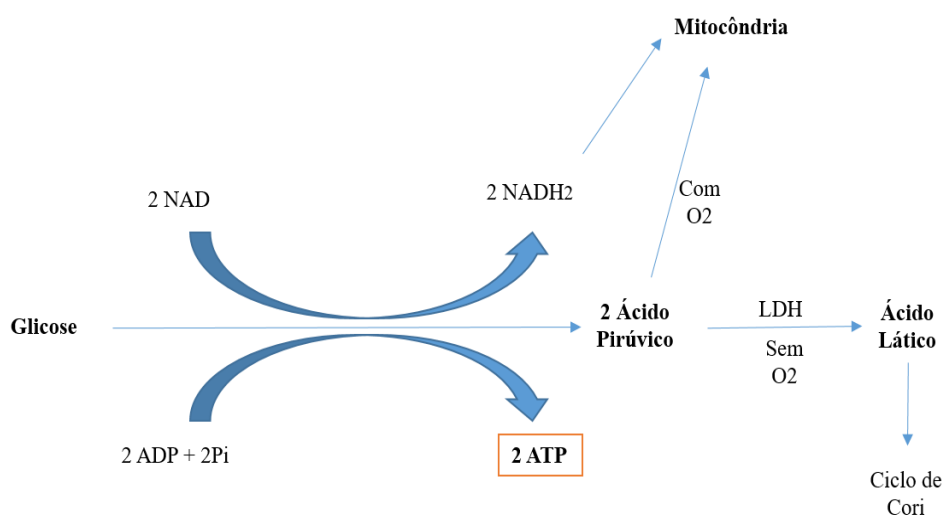


Fig. 7 – Processo da glicólise. **NAD** – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo descarregada; **ADP** – Adenosina Difosfato; **Pi** – Fósforo Inorgânico; **NADH<sub>2</sub>** – Molécula de NAD carregada com hidrogênio; **ATP** – Adenosina trifosfato; **LDH** – Lactato Desidrogenase.

### 2.5.3 Produção Aeróbica de ATP

#### 2.5.3.1 Ciclo do Ácido Cítrico (Ciclo de Krebs)

Proposto por Hans Adolf Krebs, por isso comumente chamado de ciclo de Krebs, em 1937, esse ciclo é conceituado como o principal caminho metabólico para o metabolismo aeróbico em tecido animal (AKRAM, 2014).

Trata-se de uma série de 10 reações que busca extrair o restante de energia contida na molécula de glicose (Fig. 8). Após a glicólise transformar a molécula de glicose em duas de piruvato, esses compostos são direcionados para a matriz mitocondrial e lá sofrem conversão irreversível para acetil-Coenzima A (acetil-CoA, possuindo dois carbonos), molécula energética de característica intermediária, uma vez que pode ser gerada a partir de carboidrato (como no caso em questão),

gorduras (pelo processo de  $\beta$ -oxidação) e proteínas. Essa molécula de acetil-CoA iniciará o ciclo, reagindo com o oxalacetato (uma forma de ácido acético com 4 carbonos) e sofrendo a primeira reação para citrato (molécula com seis carbonos), catalisada pela enzima citrato sintase (CS) (POWERS; HOWLEY, 2005, p. 35). A CS tem papel fundamental no metabolismo energético aeróbico e a mensuração de sua atividade revela a eficiência energética do organismo estudado (HOLLOSZY; BOOTH, 1976).

Apesar desse ciclo gerar ATP, sua principal função é extrair elétrons (H) que serão encaminhados para a crista mitocondrial e participar da cadeia respiratória (cadeia transportadora de elétrons). Como saldo final das reações do ciclo de Krebs temos: a cada 1 molécula de acetil-CoA oxidada formam-se: 3 NADH, 1 FADH<sub>2</sub> e 1 GTP (Guanosina Trifosfato - molécula tão energética quanto o ATP, com apenas diferença estrutural (AKRAM, 2014)).

Apesar do O<sub>2</sub> não participar diretamente dessas reações, esse processo só acontece em condições aeróbicas.

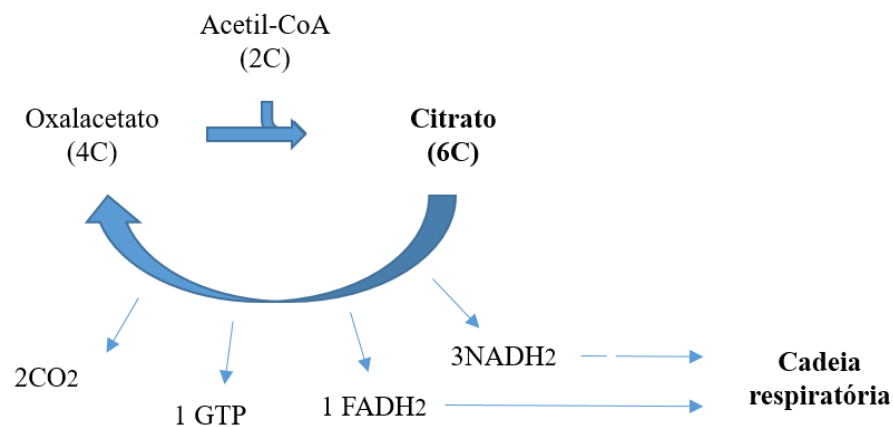


Fig. 8 – Esquema do Ciclo do Ácido Cítrico. **FADH<sub>2</sub>** – Flavina Adenina Dinucleotídeo descarregada; **NADH** – Molécula de NAD carregada com hidrogênio; **GTP** – Guanosina trifosfato; **CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono.

### 2.5.3.2 Cadeia Respiratória (cadeia transportadora de elétrons)

Nesse processo, chamado de fosforilação oxidativa, a produção de ATP ocorre graças a um mecanismo que usa a energia potencial dos transportadores de hidrogênio reduzidos (NADH e FADH) para fosforilar a ADP em ATP. De maneira geral, o processo acontece da seguinte maneira: existe, na membrana interna da mitocôndria (crista mitocondrial) uma série de canais (citocromos) que funcionam lançando os elétrons de hidrogênio da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas (entre membrana externa e interna da mitocôndria). A medida que esses elétrons são lançados, a energia gerada serve para bombear os prótons de hidrogênio (H<sup>+</sup>) para fora da matriz mitocondrial, criando um gradiente acentuado de H<sup>+</sup> e que ao retornar para dentro da matriz

mitocondrial (através de um canal especializado chamado ATP sintetase) gera energia suficiente para fosforilar a ATP ( $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ ). Outro subproduto desse processo são moléculas de água. Portanto, o  $\text{O}_2$  tem sua participação nessa via energética servindo como acceptor final dos átomos de hidrogênio para se fundirem e formarem água (Fig. 9).

Finalmente, a produção final total de energia partindo de uma molécula de glicose, incluindo glicólise, ciclo de Krebs e cadeia respiratória, é de 32 moléculas de ATP, quando é utilizada a lançadeira malato-aspartato, e de 30 moléculas de ATP, ao utilizar a lançadeira glicerol fosfato. Esse sistema energético passa a contribuir mais ativamente para a geração de energia em atividades acima de 2-3 minutos. A eficiência global da respiração aeróbica é de ~34%, enquanto que o restante é liberado em forma de calor. É nesse momento também que ocorre a maior produção de radicais livres de uma célula (POWERS; HOWLEY, 2005, p. 40–44).

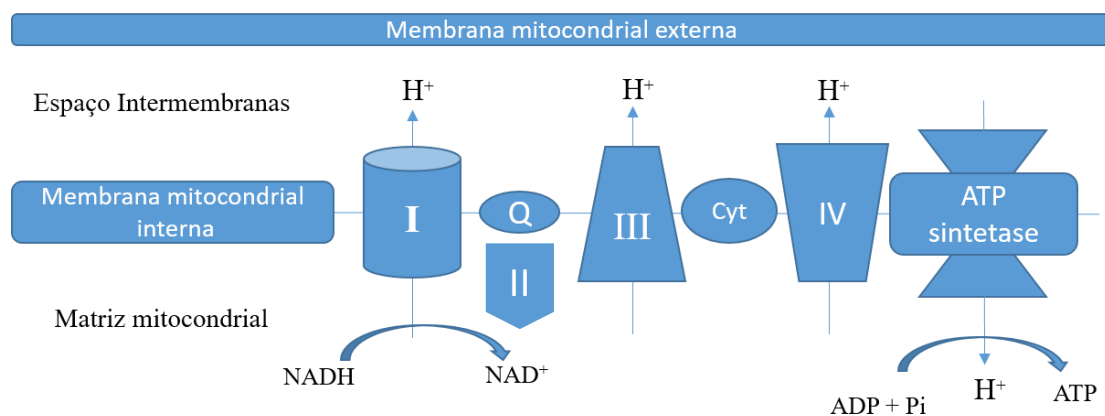


Fig. 9 – Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons. **Complexos I, III e IV** – Proteínas integrais de membrana responsáveis por bombear os  $\text{H}^+$  para o espaço intermembranas; **Complexo II** - Proteína de membrana; **Q** – Coenzima Q ou Ubiquinona, responsável por transportar elétrons do complexo I e II ao complexo III; **Cyt** - Citocromo c, responsável por transportar os elétrons do complexo III ao complexo IV; **ATP sintetase** – Responsável por fosforilar o ADP em ATP.

#### 2.5.4 O *Continuum* da Bioenergética

Da forma como são apresentados os sistemas de transferência de energia se tem uma errônea ideia de que cada via energética é acionada apenas e exclusivamente em determinadas condições de tempo e intensidade, mas esse mecanismo de geração de energia deve ser visto como um espectro, um *continuum*. De fato, em movimentos mais potentes (curtos, rápidos e intensos) os sistemas energéticos anaeróbicos assumem praticamente sozinhos a responsabilidade de disponibilizar ATP para as células. Nessa condição, ATP-CP e glicólise láctica (sem participação do  $\text{O}_2$ ) provem a energia necessária para manter a contração muscular. Porém, com exceção desse esforço extremo e curto, o que acontece é que a maioria dos tipos de exercício utilizam uma mistura, uma combinação desses

sistemas, e quem determina a predominância de cada sistema em cada atividade é a intensidade e duração em que ela é realizada (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2002, p. 130).

De modo geral, quanto maior a intensidade e menor a duração de uma atividade, maior será a contribuição dos sistemas anaeróbicos para geração de energia, enquanto que na situação inversa (menor intensidade e maior duração) o sistema aeróbico predomina e têm maior participação (POWERS; HOWLEY, 2005, p. 46).

#### 2.5.5 Obesidade e metabolismo energético

O tecido adiposo era responsável única e exclusivamente pelo estoque energético e termogênese, ideia aceita pela comunidade científica até aproximadamente três décadas atrás. Esse conceito começou a mudar com observações acerca do metabolismo de esteroides sexuais (SIITERI, 1987) e do hormônio adipina (FLIER *et al.*, 1987) associados aos adipócitos. Hoje o tecido adiposo é visto como um órgão endócrino responsável pela produção de uma variedade de hormônios cuja atuação engloba desde controle do apetite até marcadores de inflamação e utilização de substratos energéticos pelas células assumindo papel central na regulação metabólica (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007; KERSHAW; FLIER, 2004).

A soma de fatores relacionados a obesidade como a desregulação da secreção de adipocitocinas como Leptina (associada à saciedade e homeostase energética) (COLL; FAROOQI; O'RAHILLY, 2007) e adiponectina (efeito antidiabetogênico e anti-inflamatório) (LIU; SWEENEY, 2013), o estresse oxidativo sistêmico (KEANEY *et al.*, 2003), a disfunção mitocondrial (CHENG; ALMEIDA, 2014) e a resistência à insulina (JOHNSON; OLEFSKY, 2013) tecem um cenário inflamatório que perturbam a homeostase energética, gerando um ciclo vicioso com grande potencial deletério ao organismo como um todo.

#### 2.6 Exercício físico

“O movimento representa mais que uma simples conveniência; é fundamental para nosso desenvolvimento evolucionário – não é menos importante que as complexidades do nosso intelecto e da emoção” (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2002, p. 3). O movimento humano é natural, é essencial. A hipocinética é prejudicial (WHO, 2009).

Em 1985, Carl Caspersen liderou um estudo epidemiológico a fim de definir as diferenças entre atividade física e exercício físico com base nos estudos publicados até então. Os resultados

dessas diferenças são apresentados na figura abaixo (Fig. 10). Dessa forma, percebe-se que a diferença entre exercício físico e atividade física consiste em como ele é realizado (planejado, estruturado e repetitivo) e que nessa situação existe um objetivo de melhorar determinadas qualidades físicas e variáveis fisiológicas (CASPERSEN *et al*, 1985).

Atividade física	Exercício físico
Movimentos corporais via músculos esqueléticos	Todos esses já citados  <b>Planejado, estruturado e repetitivo</b>  <b>Com objetivo de aprimorar componentes da saúde física</b>
Resulta em gasto calórico	
Esse gasto calórico varia de baixo a alto	
Se correlaciona positivamente com saúde física	

Fig. 10 – Diferenças entre atividade física e exercício físico. Adaptado de Caspersen *et al* (1985).

Inúmeros estudos avaliaram a relação entre o exercício físico e melhorias em várias condições, em diferentes idades e com diferentes ideais, e em muitos deles a prática do exercício físico se mostrou eficaz no objetivo proposto. Porém, para atender a característica “estruturado” do exercício físico, identifica-se duas principais variáveis que influenciam nesse contexto, que são elas: duração (tempo de atividade) e intensidade (velocidade; sobrecarga).

Os exercícios físicos podem ser divididos entre (1) contra resistência (musculação), onde a contração muscular é intensa, de curta duração e o objetivo é fortalecer o sistema músculo-esquelético; e (2) exercícios aeróbicos que, por sua vez, podem ser divididos entre (1) com intensidade moderada contínua e (2) intercalando intensidade alta e baixa. Dependendo da estrutura das variáveis de uma sessão de treino físico são alcançados diferentes resultados (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2002, p. 130, 138).

### 2.6.1 Exercício Físico e Radicais Livres

Os primeiros estudos relacionando exercício físico com geração de radicais livres (utilizando biomarcadores de lipoperoxidação) em tecido muscular esquelético datam da década de 70 (BRADY

*et al.*, 1979; DILLARD *et al.*, 1978) e estão associados ao início de uma nova grande área na investigação dos efeitos dos radicais livres no corpo, porém, desta vez em exercício físico.

Não levou muito tempo para descobrirem que o treinamento físico aeróbico (*endurance*), associado ao aumento da produção de agentes oxidantes, apresentava, paradoxalmente, aumento na expressão de enzimas antioxidantes, resultando em melhorias nas defesas antioxidantes dos sistemas cardiovascular e músculo-esquelético (QUINTANILHA; PACKER, 1983), tratando-se então de um mecanismo adaptativo.

Paracelso, médico e físico do século XVI, já disse “A diferença entre o remédio e o veneno é a dose”. Essa máxima ganhou um termo próprio em 1943 nos trabalhos de Virchow e Schulz, cunhando e definindo Hormese (*hormesis*, do inglês) como um fenômeno de dose-resposta onde estímulos leves de substâncias nocivas levam a uma adaptação, criando resistência, enquanto que doses altas levam a toxicidade. Pode-se, também, usar o termo “resposta adaptativa por estresse” (CALABRESE, 2008). E é sobre esse mecanismo que se apoia a ideia de que a o aumento na geração de radicais livres durante exercício levam a uma adaptação e aprimoramento na resistência das células a essas substâncias, diminuindo os danos sofridos por elas. Esse mecanismo é bastante documentado em exercícios com intensidade moderada, melhorando a proteção contra o estresse oxidativo no cérebro, fígado, rim (NAVARRO *et al.*, 2004), músculo esquelético (LEEUEWENBURGH C., FIEBIG R., CHANDWANEY R., 1994) entre outros sistemas, porém, ainda não está claro em relação a exercícios de alta intensidade, com estudos apresentando aumento do estresse oxidativo nessas condições (GOTO *et al.*, 2003), enquanto outros autores relatam a redução do mesmo (ARO *et al.*, 2015). Conforme cita Powers (2016), ainda existe muito o que aprender no campo do exercício físico e estresse oxidativo.

### 2.6.2 Exercício aeróbico intervalado *versus* contínuo

O consumo de oxigênio por um organismo configura um bom método para estabelecer a intensidade em que este se encontra. Uma vez que encontramos a capacidade máxima de consumir oxigênio ( $VO_{2m\acute{a}x}$ ), conseguimos calcular seus percentuais. E é com essa ferramenta que se estabelece a variável “intensidade” em uma sessão de treinamento físico aeróbico (WHIPP; WARD; ROSSITER, 2005).

Segundo de Feo (2013), nas duas últimas décadas muitos pesquisadores focaram seus estudos em testar vários modelos de treinamento, com diferenças estruturais, como frequência, duração, intensidade, volume e mesmo comparando o exercício aeróbico com o resistido. O treinamento

aeróbico contínuo de intensidade moderada é bastante conhecido e indicado para redução e controle de adiposidade corporal (HASKELL *et al.*, 2007), devido ao substrato predominante na produção energética - lipídeos (BROOKS; MERCIER, 1994), porém, o treinamento intervalado de alta intensidade (High-intensity Interval Training - HIIT), ganhou notoriedade por conta dos resultados que vem apresentando. Gibala *et al* (2006) realizou um estudo comparando o treino intensivo com o moderado e encontrou melhoras na capacidade oxidativa do músculo, em ambos os protocolos, em apenas duas semanas, porém, o tempo total de treinamento por sessão foi de 90 a 120 minutos, no modelo de intensidade moderada, e de 18 a 27 minutos com o treinamento de alta intensidade. Em outro estudo, realizado por Terada *et al* (2001) se concluiu que o HIIT é eficaz no processo da biogênese mitocondrial.

Tremblay *et al* (1994) encontrou redução significativa de gordura subcutânea utilizando-se do HIIT. Little *et al* (2010) relata ter encontrado, em estudo com sete homens jovens, melhora na capacidade oxidativa e aumento do glicogênio muscular em repouso após duas semanas de treinamento intensivo. Moholdt *et al* (2014) afirma que esse protocolo vem sendo utilizado na Noruega com reabilitação cardíaca, uma vez que foi possível verificar melhora significativa na capacidade aeróbica máxima ( $VO_2$ máx) de indivíduos com doença arterial coronariana.

Ainda que já ocorra uma tendência forte acerca dos benefícios do HIIT (BURGOMASTER *et al* 2008; GIBALA *et al* 2006), mecanismos ainda precisam ser estudados e elucidados, uma vez que existem diferentes maneiras de executar o treinamento de alta intensidade e possivelmente diferentes respostas fisiológicas.



### 3 INTERDISCIPLINARIDADE

Quando se trata de saúde é praticamente impossível não associar, direta ou indiretamente, ao ambiente. Em alguns casos essa conexão é mais visível, mais superficial, como por exemplo quando se verifica a qualidade da água de um local e seu impacto na saúde dos moradores. Em outros casos, como no apresentado neste trabalho, essa relação é um pouco menos óbvia, ainda que estreita.

Quando um indivíduo se encontra na condição de obesidade, cujo conceito já foi definido, alguns efeitos negativos são sentidos, prejuízos fisiológicos se destacam, mas partindo de um outro ponto de vista, financeiros e ambientais também contribuem. O indivíduo obeso geralmente se alimenta de forma exacerbada (salvo exceções em que a obesidade é consequência de endocrinopatias, como no hipotireoidismo, ou efeito colateral de tratamentos, como a ação prolongada de corticoides), e esse padrão de consumo alimentício é acompanhado por um maior uso de embalagens e matéria-prima, e envolve todo um outro mercado que possui sua própria parcela de uso do meio ambiente, aumentando a geração de lixo. Segundo pesquisa da *Strategic & Research Center da EAE Business School*, o mercado de *fast food* brasileiro movimentou, em 2014, mais de 12 milhões de euros no segmento, o classificando como o quarto país que mais consome *fast food* no mundo. Nessa conta entra, de forma camuflada, mas inerente, o consumo de plástico, papel entre outros insumos para confeccionar embalagens. O mesmo plástico utilizado para guardar uma bebida industrializada que contribui com o aumento de peso pode vir a se tornar mais um vilão da vida marinha, juntamente com as outras 7 a 35 mil toneladas de plástico presente na superfície dos oceanos da Terra (COZAR *et al.*, 2014), matando a vida nos diversos níveis tróficos.

Além dessa situação, a condição de obesidade é acompanhada por doenças (co-morbidades) cujos tratamentos poderão impactar, novamente, no aspecto econômico e ambiental, sendo pela necessidade de comprar os medicamentos bem como pela excreção destes fármacos no ambiente, tópico este que é acompanhado, com merecida atenção, por organizações como a *Food and Drugs Administration (FDA)*, *Centers for Disease, Control and Prevention (CDC)*, ambas dos Estados Unidos, bem como a Organização Mundial da Saúde.

O exercício físico regular é considerado um agente promotor de melhorias nos mais diversos âmbitos, auxiliando tanto na diminuição do tecido adiposo bem como na redução das dosagens de fármacos administrados para as mais diversas co-morbidades, como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial e até alguns tipos de câncer. Um maior entendimento dos efeitos da atividade física no organismo poderá colaborar com esse contexto auxiliando no processo não-medicamentoso de emagrecimento e freando toda a cascata de efeitos negativos da obesidade.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos da raça Wistar obtidos do biotério da UNIVALI (Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Brasil), os quais foram divididos, em número igual, nos seguintes grupos:

- 1 Grupo Dieta Normolipídica - Sedentário (DNL-SED, n=6);
- 2 Grupo Dieta Hiperlipídica - Sedentário (DHL-SED, n=6);
- 3 Grupo Dieta Hiperlipídica - Treinamento contínuo (DHL-TC, n=6);
- 4 Grupo Dieta Hiperlipídica - Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (DHL-HIIT, n=6)

O ciclo claro-escuro foi invertido (12h-12h) para melhor aproveitamento do período ativo dos animais para a realização dos treinos.

A pesquisa seguiu as orientações das diretrizes governamentais para o cuidado com animais de laboratório, e teve seu início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Univille, sob o ofício de número 009/2016.

### 4.2 Protocolo Experimental

#### 4.2.1 Indução dietética da obesidade

Os animais dos grupos experimentais (DHL) foram alimentados com dieta hiperlipídica, composta por 20% das calorias provenientes de carboidratos, 20% de proteínas e 60% de lipídeos (Prag Soluções Biosciências, Jaú, São Paulo-SP), durante oito semanas, a fim de induzir à condição de obesidade. Os animais controle (DNL) foram tratados com dieta padrão (70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de lipídeos) (Nuvital Nutrientes, Curitiba, Paraná, Brasil). Todos os animais receberam água *ad libidum*.

	Qtde (p/p)	Kcal	%Kcal
<b>Matéria Mineral</b>	5%	0	0%
<b>Proteína Bruta</b>	26%	1040	19,89%
<b>Extrato Etéreo (gordura)</b>	35,5%	3105	59,38

<b>Fibra Bruta</b>	8%	0	0%
<b>Carboidratos</b>	26,5%	1060	20,27
<b>Total</b>	100%	5205	-

Fig. 11 – Tabela nutricional da dieta hiperlipídica (DHL) (Prag Soluções Biosciências, Jaú, São Paulo-SP)

#### 4.2.2 Protocolos de Treinamento Aeróbico

Foi aplicado um Teste de Tolerância ao Esforço Máximo a fim de definir a velocidade máxima dos animais e então prescrever a intensidade de treino.

O teste de tolerância ao esforço máximo foi realizado para encontrar a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) que cada rato poderia correr. Essa  $V_{m\acute{a}x}$  serviu como parâmetro para a prescrição das velocidades de treinamento dos protocolos HIIT e TC. O teste de esforço máximo foi realizado em três momentos: no início, após quatro semanas e na oitava semana dos protocolos de treinamento. Seguindo o protocolo de Ferreira *et al.*, (2007), o teste consistiu em uma corrida em esteira ergométrica (modelo KT-4000, IMBRAMED), com inclinação de 20 graus, sendo a velocidade inicial de 6m/min com incremento de 3m/min a cada três minutos, até a exaustão do animal (visível fadiga). Assim que encontrada a velocidade  $V_{m\acute{a}x}$ , a distância e a velocidade foram computadas para cálculo da intensidade de treinamento.

Ambos os protocolos de treinamento aconteceram com frequência de cinco dias na semana, 20 graus de inclinação da esteira e intensidades definidas a partir do teste de tolerância ao esforço. O HIIT aconteceu em três minutos à intensidade de 60% seguidos de quatro minutos à 85% da velocidade máxima de teste (FERREIRA *et al.*, 2007). Este ciclo se repetiu sete vezes, totalizando 49 minutos de treinamento. No TC, a intensidade do exercício se manteve em 60% da velocidade máxima de teste e a duração do treinamento foi a necessária para igualar a distância percorrida no treinamento HIIT (protocolos isocalóricos), totalizando aproximadamente 60 minutos. Ambos os protocolos foram precedidos de dez minutos de aquecimento a 40% de intensidade.

Os animais que constituíam o grupo sedentário (SED) realizavam a caminhada a 40% de intensidade, duas vezes na semana, a fim de manter a capacidade de deambulação dos animais para as realizações dos testes físicos posteriores.

Após o término da oitava semana de treinamento aeróbico (17 semanas de experimento), ocorreu o sacrifício dos animais (48h após a última sessão de treino), na ausência de anestesia (devido às técnicas de estresse oxidativo), e pelo método de decapitação. O músculo gastrocnêmio foi

removido para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo energético. Os experimentos foram realizados conforme as normas da legislação e ética para a prática didático-científica da vivissecação de animais de acordo com a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais (BRASIL, 2008).

#### 4.3 Preparação dos tecidos

Os tecidos utilizados neste estudo pertencem ao ensaio intitulado “EFEITOS DE DOIS PROTOCOLOS DE TREINAMENTO AERÓBICO SOBRE O FENÓTIPO DAS FIBRAS MUSCULARES DE RATOS OBESOS”, sob supervisão do CEP (007/2014 PRPPG/CEP), que foi realizado durante o ano de 2015 e estiveram, desde então, armazenados no freezer à -80°C, no Laboratório de Biologia Molecular da Univille. Os tecidos foram removidos, descapsulados e mantidos em gelo com tampão salina (154 mM NaCl, 5 mM Tris-HEPES, pH 7.5). O homogeneizado (15%) (p/v) foi preparado em tampão fosfato de sódio 20 mM com KCl 140 mM pH 7,4 usando homogeneizador Potter-Elvehjem (10 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a 3000 rpm (4°C) por 15 minutos para remoção de resíduos celulares. O sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior determinação dos parâmetros de metabolismo energético e de estresse oxidativo.

#### 4.4 Protocolos de Análises

##### 4.4.1 Análise dos parâmetros de estresse oxidativo

##### 4.4.1.1 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

TBA-RS é usado como um índice de dano a lipídeos e mede o malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por radicais livres hidroxila. Foi determinado pelo método de Ohkawa *et al* (1979). Os tecidos e plasma foram misturados com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecido num banho de água fervente durante 60 min. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes TBA-RS foi determinado espectrofotometricamente a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído por mg de proteína.

#### 4.4.1.2 Proteínas Carboniladas

A carbonilação das proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Reznick and Packer (1994), o qual se baseia na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazina, um composto amarelo, que foi medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200  $\mu$ L de tecido homogeneizado foi adicionado a tubo de ensaio contendo 400  $\mu$ L de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M). Foi então mantido no escuro durante 1h e agitado em vórtex a cada 15 min. Depois disso, 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 20% foi adicionado a cada tubo. A mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 14000 rpm durante 3 min. O sobrenadante obtido foi descartado. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol: acetato de etila (1: 1, v / v), agitado em vórtex e centrifugado a 14000 rpm durante 3 min. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspensão em 600  $\mu$ L de guanidina 6M (preparado em solução de fosfato de potássio 20 mM pH 2,3). A amostra foi submetida à vórtex e incubada à 60°C durante 15 min. Centrifugada, então, a 14000 rpm durante 3 min e o sobrenadante foi usado para medida da absorbância em espectrofotômetro a 370 nm. Os resultados são relatados como conteúdo de carbonila (nmol / mg de proteína).

#### 4.4.1.3 Conteúdo Total de Sulfidrilas

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tióis, gerando um derivado amarelo (TNB) que é mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50  $\mu$ L de tecido homogeneizado foi adicionado a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1 mM. A reação é iniciada pela adição de 30  $\mu$ L de DTNB 10,0 mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

#### 4.4.1.4 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984). A decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorada em espectrofotômetro a 240 nm por 90 segundos, em meio de reação contendo 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de tampão de fosfato de potássio pH 7,0, e proteína 0,1-0,3mg / mL. Uma unidade é definida como 1 $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT por mg de proteína.

#### 4.4.1.5 Glutationa Peroxidase (GSH-Px)

A atividade da GSH-Px foi determinada pelo método de Wendel (1981) com algumas modificações. O tert-butil-hidroperóxido foi utilizado como substrato da reação. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 4 minutos. O meio continha GSH 2mM, GSH redutase 0,15U/ml, azida 0,4mM, tertbutyl- hidroperóxido 0,5mM e NADPH 0,1mM. Uma unidade de enzima é definida como 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é expressa em unidade por mg de proteína.

#### 4.4.1.6 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985). Resumidamente, adicionou-se à 15  $\mu\text{L}$  de amostra, 215 $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo tampão Tris 50 uM pH 8,2 e EDTA 1  $\mu\text{M}$  e 30 uM de CAT. Subsequentemente, foram adicionados 20 uL de pirogalol e a absorbância foi registrada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A atividade específica é expressa em unidade por mg de proteína.

### 4.4.2 Análise dos Parâmetros do Metabolismo Energético

#### 4.4.2.1 Citrato Sintase

A atividade máxima da enzima citrato sintase foi determinada por método fotométrico determinado por Alp *et al* (1976), por meio da quantificação do complexo formado (coenzima A (CoA) + ácido 5,5'-ditio-bis 2 nitrobenzóico [DTNB]), adicionado ao meio. Os músculos foram homogeneizados em tampão fosfato (50 mM PBS, pH 7,4 + 1 mM EDTA) e centrifugados à 12000 rpm durante 15 minutos (4°C). A mistura de ensaio foi constituída por Tris-Base (100 mM), EDTA (1 mM), DTNB (0,2 mM), acetil-CoA (0,1mM), Triton X-100 (1%, v:v) e amostra. A reação é iniciada pela adição de oxaloacetato (4 mM) e a leitura de absorbância foi realizada em 412 nm e acompanhada por 3 minutos (25°C). A atividade é expressa em nmol de substrato consumido por minuto e os resultados são corrigidos pela quantidade de proteína citosólica utilizada no ensaio.

#### 4.4.2.2 Atividades do Complexo II e Succinato Desidrogenase

As atividades do complexo II e succinato desidrogenase, no músculo gastrocnêmio, foram determinadas pelo método descrito por Fischer *et al* (1985), acompanhando o decréscimo na absorbância devido a redução do 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm com 700 nm de comprimento de onda como referência ( $\epsilon=19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), na presença de fenazina metossufato (PMS). A mistura

da reação consistindo de 40 mM de fosfato de potássio, pH 7,4, 16.0 mM succinato e 8  $\mu$ M DCIP foi pré-incubada com 40-80  $\mu$ g da proteína homogeneizada a 30°C por 20 minutos. Subsequentemente, para a atividade do complexo II, 4 mM azida sódica, 7  $\mu$ M rotenona e a reação foi iniciada pela adição de 40  $\mu$ M de DCIP e foi monitorada por 5 minutos.

A atividade da succinato desidrogenase foi obtido pelo mesmo meio de incubação pela adição de 1 mM de PMS e monitorada por 5 minutos.

#### 4.4.2.3 Atividade da Citocromo C Oxidase

A atividade da citocromo c oxidase foi determinada pelo método descrito por Rustin *et al* (1994). A atividade enzimática foi mensurada acompanhando o decréscimo na absorbância devida a oxidação do citocromo c previamente reduzido. Foi utilizado comprimento de onda de 550 nm sendo 580 como comprimento de onda de referência ( $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). O buffer de reação continha 10 mM de fosfato de potássio, pH 7, 0,6 mM, *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside e 2-4  $\mu$ g de homogenato de proteína. A reação foi iniciada pela adição de 0,7  $\mu$ g de citocromo c reduzido.

A Atividade do citocromo c oxidase foi mensurada a 25°C por 10 minutos.

#### 4.4.2.4 Atividade da Piruvatoquinase

A atividade da piruvatoquinase foi determinada pelo método descrito por Leong *et al* (1981).

O meio de incubação consistiu de 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, 10.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7 unidades de L-lactato desidrogenase, 0.1% (v/v) Triton X-100, and 10  $\mu$ L do sobrenadante (livre de mitocôndrias) em um volume final de 0,5 mL. A reação foi iniciada depois de 30 minutos de pré-incubação adicionando 1 mM de fosfoenolpiruvato (PEP).

Todos os ensaios foram realizados em duplicata a 25°C. Os resultados são expressos como  $\mu$ mol de piruvato formado por minuto por mg de proteína.

#### 4.4.3 Dosagem de proteínas

A determinação das proteínas para análise dos parâmetros de estresse oxidativo e de metabolismo energético no músculo esquelético (gastrocnêmio) e no tecido adiposo retroperitoneal foi realizada pelo método de Lowry *et al* (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

#### **4.5 Análise Estatística**

Os resultados nos diferentes grupos foram representados como média  $\pm$  desvio padrão, analisados através do Programa SPSS para Windows, versão 12 (SSPS, Chicago, IL, USA), utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de Duncan, para comparação entre as médias dos grupos, sendo que os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. O programa GraphPad Prim 5 foi utilizado para a confecção dos gráficos.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EFFECTS OF MODERATE-INTENSITY VS HIGH-INTENSITY AEROBIC TRAINING ON OXIDATIVE STRESS AND ENERGY METABOLISM IN THE SKELETAL MUSCLE OF RATS ON HIGH-FAT DIET-INDUCED OBESITY

Victor Hugo Antonio Joaquim<sup>1</sup>; Thayná Maia Patachini<sup>2</sup>; Carla Coelho-Werlang<sup>3,4</sup>, Débora Delwing-Dal Magro<sup>5</sup>; Maitê Beatriz Bruckheimer<sup>2</sup>, Matheus Henrique Ruela Mews<sup>6</sup>, Geraldo Antonio Bunick Neto Sala<sup>2</sup>, Daniela Delwing-de Lima<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Educação Física, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

<sup>4</sup> Departamento de Química, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC-Joinville), Rua Paulo Malschitzki, 200 - Zona Industrial Norte, CEP 89219-710, Joinville, SC, Brazil.

<sup>5</sup> Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

<sup>6</sup> Departamento de Farmácia, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

**\*Corresponding author:** Daniela Delwing-de Lima (e-mail: [danielwing@hotmail.com](mailto:danielwing@hotmail.com); [daniela.delwing@univille.br](mailto:daniela.delwing@univille.br)). Phone: +55 47 984564894; Address: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

## ABSTRACT

**Introduction:** Current concerns about obesity are mainly due to its pandemic profile and its associated health risks. Physical exercise plays an important role in the prevention, control and treatment of this condition. However, this non-surgical and non-drug therapy can be performed in different types of modalities and employing different technical structures of training. **Objective:** This study aimed to evaluate the energy metabolism and oxidative stress adaptations induced by high intensity interval training versus moderate intensity continuous training in the skeletal muscle of obese rats. **Materials and Methods:** Adult male *Wistar* rats were randomly assigned into high-fat diet (HFD) or normal diet (ND), during 8 weeks. Upon completion of 8 weeks of the diet, animals from the HFD were randomly assigned to one untrained group (HFD-UNT) and two groups trained with different aerobic exercise training protocols, HFD-Moderate Intensity Continuous Training (MICT) and HFD-High-Intensity Interval Training (HIIT). Animals from the ND were assigned to one untrained group (ND-UNT). These four experimental groups underwent 8 more weeks of diet and training. **Results:** HFD did not induce a significant change in the animals' body mass, however, the HFD-UNT and HFD-MICT groups presented significantly higher amounts of intraabdominal adipose tissue. MICT increased catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and decreased thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS). The HIIT protocol increased CAT and SOD, decreased TBA-RS and increased the protein carbonylation. With regard to energy metabolism, MICT increased citrate synthase (CS), succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome c oxidase (COX) and complex II, while HIIT increased pyruvate kinase (PK), CS and COX, but did not up regulate SDH or complex II. **Conclusion:** In summary, both training protocols showed similar outcomes for oxidative stress and energy metabolism parameters, leading to the classification of HIIT as a time-efficient training protocol.

**Keywords:** Obesity; Aerobic Exercise Training; Oxidative Stress; Skeletal Muscle.

## INTRODUCTION

According to the last global report on noncommunicable diseases, in 2014, 11% of men and 15% of women were obese (more than the double compared to three decades ago (WHO 2014)). Obesity is considered to present one of the greatest risks of mortality (responsible for 5% of deaths worldwide) by increasing the risk of chronic diseases, such as type 2 diabetes, (T2DM), heart disease and cancer (WHO 2009). This global obesity epidemic has become a huge public health issue.

Studies shows that obesity causes impairments in energy metabolism, mainly related to the capacity to oxidize fat (Blaak and Saris 2002). Human and animal models show alterations in the activity of energy metabolism enzymes, such as citrate synthase and complex II (Bonnard et al. 2008, Bharadwaj et al. 2015). Obesity is also associated with an inflammatory condition (O'Rourke 2009). Several studies have reported that overweight and obese individuals present increased levels of proinflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor –  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), C- Reactive Protein (CRP), interleukin-6 (IL6) and others (Vegiopoulos et al. 2017). When overexpressed, these cytokines can induce the organism to a low-grade systemic inflammatory state, called metabolic inflammation. In turn, this condition is associated with an increased production of free radicals and reactive oxygen species (ROS) (Schottker et al., 2016), molecules related to the production of energy by the cells; as such, the over production of these molecules can modulate physiological conditions to a pathological oxidative stress (OS) condition.

OS is defined as when ROS generation exceeds the production of antioxidant agents, creating an imbalance between these two classes of molecules. Lipids, proteins, DNA and RNA bases are the most injured structures leading to a large number of disturbances and diseases (Kehrer and Klotz 2015). Studies suggest that OS can also be associated with skeletal muscle mitochondrial dysfunction (Bonnard et al. 2008), impairing energy production.

Physical exercise, on the other hand, plays an important role in the prevention, control and treatment of these risk factors. In fact, physical inactivity kills even more than obesity (6%) (WHO 2009). Planned and structured exercise training has become an interesting non-surgical and non-drug approach to reduce the harmful effects of obesity, oxidative stress and metabolic inflammation. Evidence shows that the enzymatic antioxidant system are flexible and adapt in response to physical exercise, while cells could become more resistant to the effects of free radicals (Somani et al. 1995). This effect is more often observed in moderate-intensity physical exercise (Camiletti-Moirón et al. 2013), but studies have recently shown that higher exercise intensities also present positive results (Lu et al. 2015).

Considering the potential of physical exercise training to reduce obesity and the risk of chronic diseases, this study aimed to evaluate the energy metabolism and oxidative stress adaptations induced

by high intensity interval training versus moderate intensity continuous training in the skeletal muscle of obese rats.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animal model and experimental design**

Adult male Wistar rats (70 days old) were obtained from the UNIVALI (Universidade do Vale de Itajai, Itajai, Brazil) breeding colony, and were randomly assigned to HFD (protein, 20%; carbohydrate, 20%; and, lipid, 60% - Prag Soluções Biosciências, Jaú-SP) or normal diet (ND) (protein, 20%; carbohydrate, 70%; and, lipid, 10%; - Nuvital Nutrientes, Curitiba-PR) for 8 weeks. The rats were maintained on a light-dark inverted cycle (12:12h light-dark cycle), in a controlled environment ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) with free access to their diet and tap water. Upon completion of the 8 weeks of the diet, animals from the HFD were randomly assigned to one untrained group (HFD-UNT; n=6) and two were trained with different aerobic exercise training protocols, HFD-MICT (n=6) and HFD-HIIT (n=6). Animals from the ND group were assigned to one untrained group (ND-UNT; n=6). After this phase, these 4 experimental groups underwent 8 more weeks of diet and training. Protocols are described in detail below. All rats were euthanized three days post last training day. This study was conducted in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85–23, revised 1985), and was approved by the UNIVILLE (Universidade da Região de Joinville, Joinville, Brazil) Ethics Committee (Protocol No. 007/2014– COEA).

### **Physical Exercise Intervention**

**Adaptation to physical exercise:** During one week, all animals underwent physical exercise adaptation to the treadmill (10 minutes of exercise per session). At the end of this period, they were submitted a graded treadmill exercise test.

**Graded Treadmill Exercise Test:** The animals were placed on the treadmill and allowed to acclimatize for at least 10 minutes. Rats ran on a graded treadmill until exhaustion at  $20^\circ$  inclination; the speed started at 6 m/min and was increased by 3 m/min every 3 min until rats were unable to run (Ferreira et al. 2007). The graded treadmill exercise test was performed prior to exercise training and then during the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks of exercise training to readjust the intensity of exercise.

Both aerobic exercise protocols consisted of an 8-week program running on a motorized treadmill (KT-4000 model INBRAMED, RS, Brazil), at  $20^\circ$  inclination, 5 days a week.

**HIIT Protocol** – The animals ran during 3 min at 60% of the maximum running speed, followed by 4-min intervals at 85% of the maximum running speed, which was repeated seven times, so each HIIT session lasted for 49 min (Fig.1).

**MICT protocol** – The intensity of this protocol was fixed at 60% of the maximum running speed obtained in the graded treadmill test, and was kept unchanged throughout the entire session, matching the distance with the HIIT protocol, therefore the total volumes of both protocols presented exactly the same distance (Fig. 1).

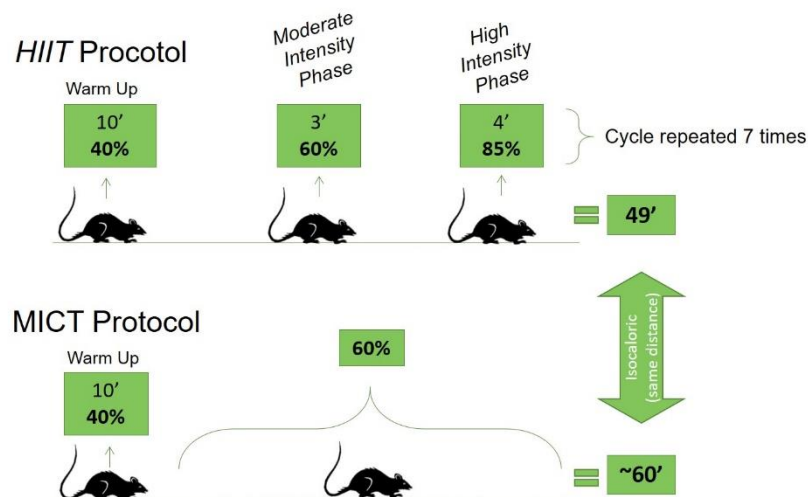


Fig 1. Schematic drawing of high intensity interval training (HIIT) and moderate intensity continuous training (MICT) protocols.

A 5-min warm up at 40% of the maximum running speed was performed by both trained groups before each training session. HFD-UNT and ND-UNT animals were placed on the treadmill twice a week for 10 min each day at 40% of the maximum running speed to maintain running skills.

After decapitation, the gastrocnemius muscle was removed and kept in ice-cold buffered sodium phosphate (20mM, pH 7.4, 140mM KCl). It was homogenized in ten volumes (1:10w/v) of appropriate buffer, according to the technique to be performed. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India); by passing 10 pulses and centrifuging at 800 x g for 10min at 4°C before discarding nuclei and cell debris. The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at -80°C for the analyses of parameters of oxidative stress and energy metabolism.

### **Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)**

TBA-RS were determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979). TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, produced mainly by hydroxyl free radicals. The gastrocnemius muscle (in 1.15% KCl) was mixed with 20%

trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were measured by determining the absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor and each curve point was subjected to the same treatment as that of the supernatants. TBA-RS contents were calculated as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

### **Total Sulfhydryl Content**

The total thiol group concentration was determined by the method of Aksenov and Markesbery (2001). Briefly, 50 $\mu$ l of homogenate were added to 1mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The reaction was started by the addition of 30 $\mu$ L of 10 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and incubated for 30 min at room temperature in a dark room. Total sulfhydryl content was determined by measuring the absorbance at 412 nm. Analyses of a blank (DTNB absorbance) was also performed. Results are reported as nmol 3-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB)/mg protein.

### **Protein Carbonyl Content**

Carbonyl content was assayed by a method described by Reznick and Packer (1994), based on the reaction of protein carbonyls with dinitrophenylhydrazine to form dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm. Briefly, 200  $\mu$ L of homogenate were added to plastic tubes containing 400 $\mu$ L of 10mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2M HCl). Samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. Subsequently, 500 $\mu$ L of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14.000 x g for 3 min and the supernatant obtained was discarded. The pellet was washed with 1mL ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed and centrifuged at 14.000 x g for 3 min. The supernatant was discarded and the pellet re-suspended in 600 $\mu$ L of 6M guanidine (prepared in a 20mM potassium phosphate solution, pH 2.3), before vortexing and incubating at 60°C for 15 min. Samples were then centrifuged at 14 000 x g for 3 min and the supernatant was used to measure absorbance at 370 nm (UV) in a quartz cuvette. Results are reported as carbonyl content (nmol/mg protein).

### **Catalase assay (CAT)**

CAT activity was assayed by the method of Aebi (1984) using a UV-visible Shimadzu spectrophotometer. The method used is based on the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm in a reaction medium containing 20mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 % Triton X-100, 10mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3mg protein/mL. One CAT unit is defined as 1 $\mu$ mol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

### **Glutathione Peroxidase assay (GSH-Px)**

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981) using *tert*-butyl-hydroperoxide as substrate. NADPH disappearance was monitored at 340nm using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The medium contained 2mM glutathione (GSH), 0.15U/mL GSH reductase, 0.4mM azide, 0.5mM *tert*butyl- hydroperoxide and 0.1mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is presented as GSH-Px units/mg protein.

### **Superoxide Dismutase assay (SOD)**

The method used to assay SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) which is a substrate for SOD (Marklund 1985). Briefly, to 15 μL of each sample, 215 μL of a mixture containing 50 μM Tris buffer, pH 8.2, 1 μM EDTA and 30 μM CAT were added. Subsequently, 20μL of pyrogallol were added and the absorbance was immediately recorded every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The inhibition of the autoxidation of pyrogallol occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assayed spectrophotometrically. A calibration curve was performed with purified SOD as reference, to calculate the activity of SOD present in the samples. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of pyrogallol autoxidation and the specific activity is reported as SOD units/mg protein.

### **Pyruvate kinase activity (PK)**

Pyruvate kinase activity was assayed essentially as described by Leong et al (1981). The incubation medium consisted of 0.1 MTris–HCl buffer, pH 7.5, 10.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 7.0 unit of L-lactate dehydrogenase, 0.1% (v/v) Triton X-100, and 10 μL of the mitochondria-free supernatant in a final volume of 0.5 mL. Unless otherwise stated, the reaction was started after 30 min of pre-incubation by the addition of 1.0 mM phosphoenolpyruvate (PEP). All assays were performed in duplicate at 25°C. Results were expressed as μmol of pyruvate formed per min per mg of protein.

### **Citrate synthase activity (CS)**

The activity of citrate synthase was assessed using spectrophotometry, as described by Alp et al., (1976). Homogenized gastrocnemius muscle samples (10μL) were added to cuvettes with 800 μL buffer (1M Tris-HCL, pH 8), 100 μL 1mM DTNB, 40 μL 2.5 mM acetyl-COA and 10 μL 10% Triton.

The reaction was started by the addition of 50  $\mu\text{L}$  of oxaloacetate (4 mM) and changes in absorbance were observed during 3 minutes at 412 nm.

### **SDH and complex II activities (CII)**

The activities of succinate:phenazine oxyreductase (soluble SDH) and complex II (succinate:DCIP oxyreductase) were measured in gastrocnemius muscle homogenates by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-dichloroindophenol (DCIP) at 600 nm with 700 nm as the reference wavelength ( $\epsilon=19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) in the presence of phenazine methasulphate (PMS), according to Fischer et al, (1985). The reaction mixture, consisting of 40.0 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16.0 mM succinate and 8  $\mu\text{M}$  DCIP, was preincubated with 40-80  $\mu\text{g}$  homogenate protein at 30°C for 20 min. Subsequently, for complex II activity, 4.0 mM sodium azide, 7  $\mu\text{M}$  rotenone were added and the reaction was initiated by the addition of 40  $\mu\text{M}$  DCIP and monitored for 5 min. The activity of SDH was accessed in the same incubation medium by the addition of 1.0 mM PMS and monitored for 5 min.

### **Cytochrome C Oxidase (COX) activity**

The activity of cytochrome c oxidase was measured according to Rustin et al. (1994). Enzymatic activity was measured by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome *c* at 550 nm with 580 nm as the reference wavelength ( $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). The reaction buffer contained 10.0 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.6 mM *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside, 2-4  $\mu\text{g}$  homogenate protein and the reaction was initiated by the addition of 0.7  $\mu\text{g}$  reduced cytochrome *c*. The activity of cytochrome c oxidase was measured at 25°C for 10 min.

### **Protein determination**

Protein was measured by the Lowry et al (1951) method, using serum bovine albumin as standard.

### **Statistical analysis**

Data are shown as mean and standard error of the means (mean  $\pm$  SEM) using SPSS software (SSPS, Chicago, IL, USA). One-way ANOVA with *post hoc* testing by Duncan was used to compare the effects of training in all analyses. Statistical significance was considered to be achieved when the p-value was  $<0.05$ .



## RESULTS

HFD did not induced a significant change in the animals' body mass. All the groups finished the experiment with similar weights. However, when the intraabdominal fat tissue was analyzed, the HFD-UNT and HFD-MICT groups, but not the HFD-HIIT group, demonstrated a significantly higher amount of this tissue ( $p<0.05$ ), compared to the ND-UNT group (Table 1).

Table 1. Total body weight (g) and intraabdominal fat weight (g).

<i>Groups</i>	<i>Body Weight (g)</i>	<i>Intraabdominal Fat (g)</i>
ND-UNT	447.3±51.1	11±4.3
HFD-UNT	442.2±58.5	24.2±6.1 *
HFD-MICT	423.2±58.1	17.4±4.0 *
HFD-HIIT	462.6±19.9	15.7±3.5

Data represent mean ± SD. ND-UNT – Normal Diet Untrained. HFD-UNT – High Fat Diet Untrained. HFD-MICT – High Fat Diet + Moderate-intensity Continuous Training. HFD-HIIT – High Fat Diet + High-intensity Interval Training. \*,  $p<0.05$  vs ND-UNT.

### **Effects of aerobic exercise training protocols on parameters of oxidative stress in the gastrocnemius muscle of HFD-fed rats**

We verified the effects of two protocols of AET (HIIT and MICT) on TBA-RS levels, total sulfhydryl content, total carbonyl content and on the activities of antioxidant enzymes CAT, SOD and GSH-Px in the gastrocnemius muscle of rats submitted to HFD. Fig. 2 shows that the HFD did present altered TBA-RS content (Fig.2A) in the gastrocnemius muscle, when compared to the ND-UNT group, and that both protocols of AET (HIIT and MICT) [ $F(3,20)=6.115$ ;  $p<0.01$ ] caused a significant decrease in TBA-RS levels, when compared to the ND-UNT and HFD-UNT groups. Furthermore, HFD did not alter the total sulfhydryl content (Fig.2B)  $F(3,20)=0.990$ ;  $p>0.05$ ] or protein carbonyl content (Fig.2C) in the gastrocnemius muscle. Neither of the protocols (HIIT and MICT) altered total sulfhydryl content, and the MICT protocol did not alter the protein carbonyl content. Conversely, the HIIT protocol increased the protein carbonyl content [ $F(3,20)=4.609$ ;  $p<0.05$ ], when compared to the control groups (ND-UNT and HFD-UNT). With regard to the antioxidant enzyme activity, HFD did not alter the activities of SOD (Fig.2D) or CAT (Fig.2E). Importantly, the MICT and HIIT protocols enhanced SOD [ $F(3,20)=6.886$ ;  $p<0.05$ ] and CAT

[F(3,20)=7.983;  $p<0.001$ ] activities in the gastrocnemius muscle, when compared to the control groups (ND-UNT and HFD-UNT). HFD significantly reduced GSH-Px enzyme activity [F(3,20)=10.038;  $p<0.001$ ] in the gastrocnemius muscle, when compared to the ND-UNT group (Fig.2F). The MICT protocol partially prevented this reduction, while the HIIT protocol did not prevent this decrease, when compared to the HFD-UNT group.

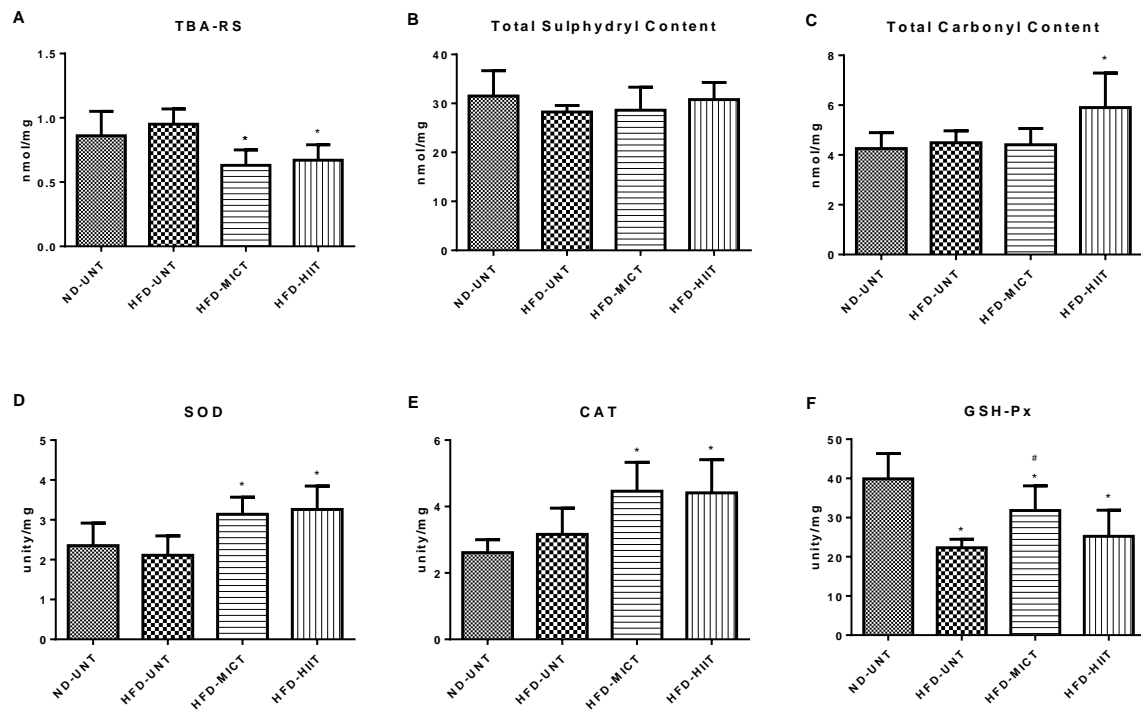


Fig. 2. Differences between experimental groups in oxidative stress biomarkers and antioxidant enzyme activities. (A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS); (B) Total sulphydryl content; (C) Protein carbonyl content; (D) Superoxide dismutase (SOD), (E) Catalase (CAT) and (F) Glutathione peroxidase (GSH-Px) in the gastrocnemius muscle of rats. Data are presented as means  $\pm$ SD. ND-UNT, Normal Diet-Untrained; HFD-UNT, High-Fat Diet-Untrained; HFD-MICT, High-Fat Diet + Moderate-intensity Continuous Training. HFD-HIIT, High-Fat Diet + High-intensity Interval Training. \*,  $p<0.05$  vs ND-UNT; #,  $p<0.05$  vs HFD-UNT.

### Effects of aerobic exercise training protocols on parameters of energy metabolism in the gastrocnemius muscle of HFD-fed rats

Next, we verified the effects of the protocols of AET (HIIT and MICT) on the activities of pyruvate kinase (PK), citrate synthase (CS), succinate dehydrogenase (SDH), complex II (CII) and cytochrome *c* oxidase (COX) in the gastrocnemius muscle. HFD significantly decreased pyruvate kinase activity (Fig. 3A) in the gastrocnemius muscle [F(3,20)=8.728;  $p<0.01$ ], when compared to the ND-UNT group and the HIIT protocol was able to prevent this alteration, while the MICT protocol did not prevent this reduction. HFD did not alter citrate synthase activity. Conversely, both protocols

were able to increase this enzyme's activity [ $F(3,20)=8.390$ ;  $p<0.01$ ], when compared to the ND-UNT and HFD-UNT groups (Fig. 3B). With regard to SDH, complex II and cytochrome *c* oxidase activities, HFD did not alter the SDH (Fig. 3C) or the complex II (Fig. 3D) activities, when compared to the ND-UNT group, but significantly decreased cytochrome *c* oxidase (Fig. 3E) activity [ $F(3,20)=7.362$ ;  $p<0.01$ ]. Furthermore, the MICT protocol increased the activity of SDH [ $F(3,20)=21.639$ ;  $p<0.001$ ] and complex II [ $F(3,20)=5,040$ ;  $p<0.01$ ] and both protocols (MICT and HIIT) prevented the reduction in the activity of cytochrome *c* oxidase, caused by the HFD, when compared to the control groups. In contrast, the HIIT protocol did not alter the activities of SDH and complex II in the gastrocnemius muscle of rats.

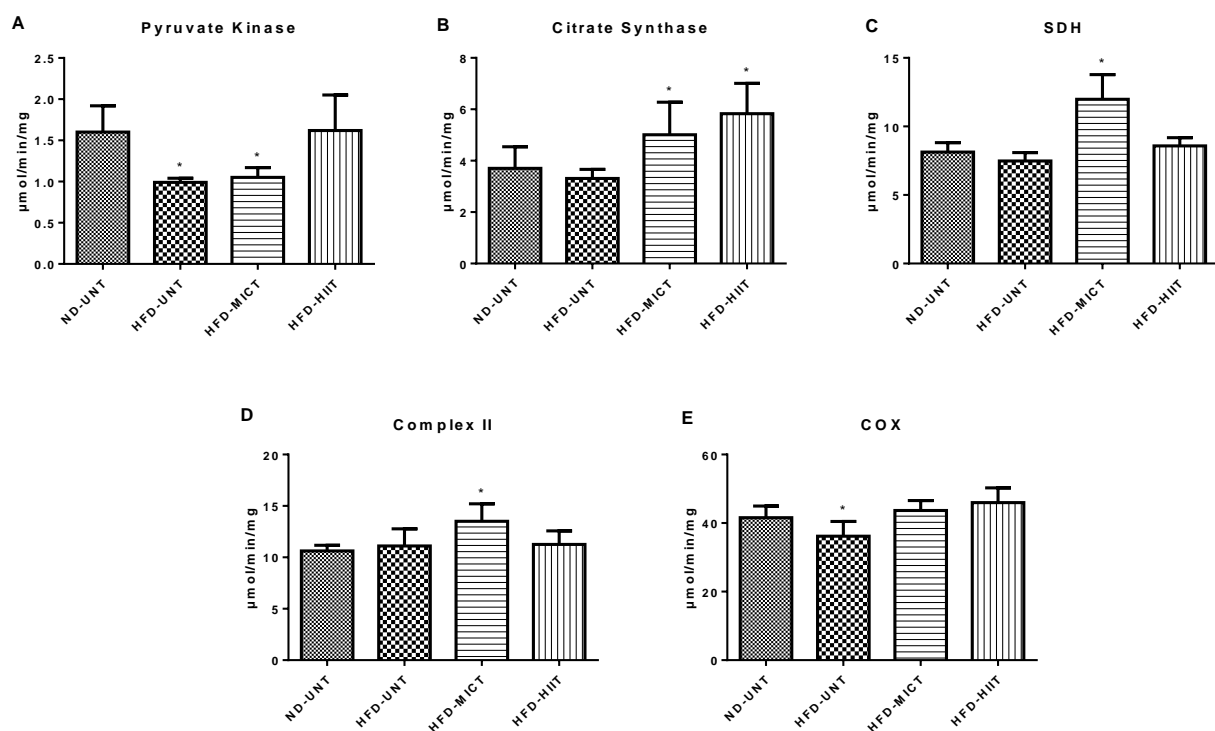


Fig. 3. Differences between experimental groups for energy metabolism biomarkers. (A) Pyruvate kinase; (B) Citrate synthase; (C) Succinate dehydrogenase (D) Complex II and (E) Cytochrome *c* oxidase in the gastrocnemius muscle of rats. Data are presented as means  $\pm$ SD. ND-UNT, Normal Diet-Untrained. HFD-UNT, High-Fat Diet-Untrained. HFD-MICT, High-Fat Diet + Moderate-intensity Continuous Training; HFD-HIIT, High-Fat Diet + High-intensity Interval Training. \*,  $p<0.05$  vs ND-UNT.

## DISCUSSION

In this study, none of the oxidative stress biomarkers (TBA-RS levels, total sulfhydryl content and protein carbonyl content) in the gastrocnemius muscle actually showed significant changes. Similar observations were made for the antioxidant system enzymes (CAT and SOD), suggesting that HFD, when used for a short time (4 months), was not able to induce an oxidative stress condition in

the gastrocnemius muscle. The GSH-Px enzyme, in contrast, demonstrated a lower activity in the HFD groups. This imbalance may represent a risk to the antioxidant system over the longer term, due to the important role that GSH-Px plays in the reduction of hydrogen peroxide and in DNA protection (Dannenmann et al. 2015).

The MICT protocol did not have an effect on total sulfhydryl content or protein carbonyl content, but a lower TBA-RS level was observed in the MICT group animals when compared with the ND-UNT and HFD-UNT groups. This result corroborates a well-known positive effect of physical exercise on oxidative stress biomarkers (Li et al. 2015). This protocol could also enhance the activity of the three antioxidant enzymes studied, CAT, SOD and GSH-Px, leading to an improvement in the activity of the enzymatic antioxidant defense system against the harmful actions of free radicals, removing superoxide radical and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and becoming more tolerant to ROS (Radak *et al.*, 2008).

The HIIT protocol did not prevent the reduction in the GSH-Px activity that was caused by HFD. It did, however, increase protein carbonylation, a marker frequently used for protein damage. However, HIIT decreased TBA-RS levels, which is sign of decreased lipoperoxidation, and enhanced the CAT and SOD activities. These positive results agree with recent studies showing adaptations of the antioxidant system following higher intensity exercise training (Fisher et al. 2011, Bogdanis et al. 2013), and reinforces evidence against the idea of applying the hormesis concept when dealing with high intensity exercise and oxidative stress physiology.

With regard to the energy metabolism of skeletal muscle, the HFD decreased the activities of PK and COX in the gastrocnemius muscle. These reductions may impair aerobic and anaerobic pathways of energy production. PK oxidizes phosphoenolpyruvate into ATP and pyruvate, at glycolysis, while COX participates in mitochondrial function. Anderson et al. (2009) found a correlation between acute and chronic high-dietary fat intake and mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. This more oxidized cellular redox environment has the potential to lead to the development of insulin-resistance in skeletal muscle (Booth et al., 2012). The HIIT protocol was able to prevent the reduction of PK in the gastrocnemius muscle, probably due to its more anaerobic exercise profile, while the MICT protocol was unable to prevent this reduction, under the conditions used. Both protocols efficiently prevented COX activity impairment, consistent with the findings of other studies (Gibala et al. 2006, Burgomaster et al. 2008), suggesting that exercise improves mitochondrial energy efficiency.

CS activity was not changed by HFD, but both the AET protocols were able to increase its levels. Despite the observations made by Bishop *et al.*, (2013) on exercise-induced oxidative capacity, volume not only has a positive effect on CS activity, but intensity also has an effect. Burgomaster et al., (2008) found similar gains of oxidative capacity in skeletal muscle following both the MICT and

HIIT protocols and Terada et al., (2001) showed that less than 5 minutes of high-intensity intermittent swimming training increased CS activity as much as 6 hours of low-intensity training per day.

Neither SDH nor CII were significantly decreased by HFD, but the MICT protocol could ameliorate its activities. HIIT was unable to improve these mitochondrial markers.

## **CONCLUSION**

HFD demonstrated expected effects on redox balance and energy metabolism enzymes. The impairment of GSH-Px activity, due to HFD, reinforces the idea of a strong link between obesity and oxidative stress. The effects on the oxidative capacity of skeletal muscle is consistent with this hypothesis. MICT was able to improve aerobic metabolism, increasing mitochondrial function, but could not recover the impairment that HFD caused in PK activity. This exercise protocol reduced lipoperoxidation and increased the activities of antioxidant defense enzymes. In addition, HIIT enhanced protein carbonylation, promoted significant fat tissue loss, improved energy metabolism in aerobic and anaerobic mechanism, increased SOD and CAT activities and decreased TBA-RS levels, also characterizing HIIT as a time-efficient exercise protocol.

## **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Universidade da Região de Joinville.

## REFERÊNCIAS

- Aebi, H. 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* **105**(1947): 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Aksenov, M.Y., and Markesbery, W.R. 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **302**(2–3): 141–145. doi:10.1016/S0304-3940(01)01636-6.
- Alp, P.R., Newsholme, E. a, and Zammit, V. a. 1976. Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* **154**(3): 689–700.
- Anderson, E.J., Lustig, M.E., Boyle, K.E., Woodlief, T.L., Kane, D.A., Lin, C., Iii, J.W.P., Kang, L., Rabinovitch, P.S., Szeto, H.H., Houmard, J.A., Cortright, R.N., Wasserman, D.H., and Neuffer, P.D. 2009. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J. Clin. Invest.* **119**(3): 573–581. doi:10.1172/JCI37048DS1.
- Bharadwaj, M.S., Tyrrell, D.J., Leng, I., Demons, J.L., Lyles, M.F., Carr, J.J., Nicklas, B.J., and Molina, A.J.A. 2015. Relationships between mitochondrial content and bioenergetics with obesity, body composition and fat distribution in healthy older adults. *BMC Obes.*: 1–11. *BMC Obesity.* doi:10.1186/s40608-015-0070-4.
- Bishop, D.J., Granata, C., and Eynon, N. 2013. Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? *BBA - Gen. Subj.* Elsevier B.V. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.012.
- Blaak, E.E., and Saris, W.H.. 2002. Substrate oxidation, obesity and exercise training. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **16**(4): 667–678. doi:10.1053/beem.2002.0226.
- Bogdanis, G.C., Stavrinou, P., Fatouros, I.G., Philippou, A., Chatzinikolaou, A., Draganidis, D., Ermidis, G., and Maridaki, M. 2013. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food Chem. Toxicol.* **61**(February): 171–177. doi:10.1016/j.fct.2013.05.046.
- Bonnard, C., Durand, D., Peyrol, S., Chanseume, E., Chauvin, M. a, Morio, B., Vidal, H., and Rieusset, J. 2008. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin resistant mice. *J Clin Invest* **118**(2): 789–800. doi:10.1172/JCI32601DS1.
- Booth, F.W., Roberts, C.K., and Laye, M.J. 2012. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr. Physiol.* **2**(2): 1143–1211. doi:10.1002/cphy.c110025.Lack.
- Burgomaster, K. a, Howarth, K.R., Phillips, S.M., Rakobowchuk, M., MacDonald, M.J., McGee, S.L., and Gibala, M.J. 2008. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J. Physiol.* **586**(1): 151–160. doi:10.1113/jphysiol.2007.142109.
- Camiletti-Moirón, D., Aparicio, V.A., Aranda, P., and Radak, Z. 2013. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **23**(4): 202–212. doi:10.1111/sms.12065.
- Dannenmann, B., Lehle, S., Hildebrand, D.G., Kubler, A., Grondona, P., Schmid, V., Holzer, K., Froschl, M., Essmann, F., and Rothfuss, O. 2015. *Stem Cell Reports.* *Stem Cell Reports* **4**: 886–898. doi:10.1016/j.stemcr.2015.04.004.

- Ferreira, J.C.B., Rolim, N.P.L., Bartholomeu, J.B., Gobatto, C.A., Kokubun, E., and Brum, P.C. 2007. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**(8): 760–765. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M.F., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C.A., and Janssen, A.J.M. 1985. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* **153**(1): 23–36. doi:10.1016/0009-8981(85)90135-4.
- Fisher, G., Schwartz, D.D., Quindry, J., Barberio, M.D., Foster, E.B., Jones, K.W., and Pascoe, D.D. 2011. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *J. Appl. Physiol.* **110**(3): 730–737. doi:10.1152/jappphysiol.00575.2010.
- Gibala, M.J., Little, J.P., van Essen, M., Wilkin, G.P., Burgomaster, K. a, Safdar, A., Raha, S., and Tarnopolsky, M. a. 2006. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J. Physiol.* **575**(Pt 3): 901–911. doi:10.1113/jphysiol.2006.112094.
- Kehrer, J.P., and Klotz, L.-O. 2015. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit. Rev. Toxicol.* **45**(9): 765–98. doi:10.3109/10408444.2015.1074159.
- Leong, S.F., Lai, J.C.K., Lim, L., and Clark, J.B. 1981. Energy-Metabolising Enzymes in Brain Regions of Adult and Aging Rats. *J. Neurochem.* **37**(6): 1548–1556. doi:10.1111/j.1471-4159.1981.tb06326.x.
- Li, G., Liu, J.Y., Zhang, H.X., Li, Q., and Zhang, S.W. 2015. Exercise training attenuates sympathetic activation and oxidative stress in diet-induced obesity. *Physiol. Res.* **64**(3): 355–367. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Lowry, O.H., Rosebrought, N.J., Farr, A.L., and Randal, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(2): 265–275. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- Lu, K., Wang, L., Wang, C., Yang, Y., Hu, D., and Ding, R. 2015. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Mol. Med. Rep.* **12**(2): 2374–82. doi:10.3892/mmr.2015.3669.
- Marklund, S.L. 1985. Pyrogallol Autooxidation. *RA Greenwald Handbook of Methods For Oxygen Racial Research.*
- O'Rourke, R.W. 2009. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery* **145**(3): 255–259. doi:10.1016/j.surg.2008.08.038.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**(2): 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- Radak, Z., Chung, H.Y., and Goto, S. 2008. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic. Biol. Med.* **44**(2): 153–159. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029.
- Reznick, A.Z., and Packer, L. 1994. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Methods Enzymol.* **233**(1991): 357–363. doi:10.1016/S0076-6879(94)33041-7.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rötig, A., Saudubray, J.M., and Munnich, A. 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim.*

Acta **228**(1): 35–51. doi:10.1016/0009-8981(94)90055-8.

- Schottker, B., Saum, K.U., Jansen, E.H.J.M., Holleczeck, B., and Brenner, H. 2016. Associations of metabolic, inflammatory and oxidative stress markers with total morbidity and multi-morbidity in a large cohort of older German adults. *Age Ageing* **45**(1): 127–135. doi:10.1093/ageing/afv159.
- Somani, S.M., Ravi, R., and Rybak, L.P. 1995. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **50**(4): 635–639. doi:10.1016/0091-3057(94)00357-2.
- Terada, S., Yokozeki, T., Kawanaka, K., Ogawa, K., Higuchi, M., Ezaki, O., and Tabata, I. 2001. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **90**(6): 2019–2024.
- Vegiopoulos, A., Rohm, M., and Herzig, S. 2017. Adipose tissue: between the extremes. *EMBO J.* **36**(14): 1999–2017. doi:10.15252/emj.201696206.
- Wendel, A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **77**(1967): 325–333. doi:10.1016/S0076-6879(81)77046-0.
- WHO. 2009. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. *In* World Health Organization (WHO; Geneva).
- WHO. 2014. Global Status Report on Noncommunicable Diseases. *In* World Health Organization (WHO; Geneva).



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados epidemiológicos dos órgãos mundiais de saúde, abordados no corpo da revisão da literatura, são argumentos incontestáveis para justificar a problemática que motivou esse estudo. A cada dia encontram-se novas associações da obesidade com problemas na saúde. A obesidade e suas co-morbidades respondem pela morte de milhares de pessoas anualmente, além de contribuírem com o consumo de recursos e produção de lixo em larga escala. Na tentativa de promover um contra-ataque mais forte e eficaz, a Sociedade da Obesidade (The Obesity Society), classificou, em 2008, a obesidade como uma doença, deixando de ser apenas uma condição física (ALLISON *et al.*, 2008). Essa decisão (que pode ser vista como um ato de guerra) mostra a necessidade de se entender e compreender como a obesidade se desenvolve e como ela afeta o organismo, para que prevenção e tratamento eficazes sejam possíveis.

Esse estudo teve como objetivo avaliar como o organismo se comporta na condição de obesidade relacionada ao estresse oxidativo e metabolismo energético, ao mesmo tempo, procurou entender como pode-se utilizar do exercício físico como uma ferramenta de ação barata e, com base em uma literatura científica atual, eficaz no combate a essa doença.

Os diferentes protocolos de treinamento apresentaram benefícios semelhantes, com vantagens e desvantagens particulares. O treinamento contínuo se mostrou eficaz ao reduzir a lipoperoxidação, além de melhorar a atividade das enzimas antioxidantes e relacionadas a função mitocondrial. O treinamento HIIT, apesar de não modular positivamente a GSH-Px e aumentar a carbonilação proteica, conseguiu gerar resultados expressivos na redução do tecido adiposo intra-abdominal, na diminuição da lipoperoxidação, na atividade das enzimas antioxidantes e atuou positivamente no metabolismo aeróbico e anaeróbico, demandando menor tempo de sessão de treinamento, levando a creditar o HIIT como uma boa estratégia para redução da obesidade e o controle de seus efeitos deletérios.

## 7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, L.; FRANCO, M. C.; ESTEVEZ, A. G. Reactive nitrogen species in cellular signaling. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 240, n. 6, p. 711–7, 2015.
- AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.
- AKRAM, M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 3, p. 475–478, 2014.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001.
- ALLISON, D. B. et al. Obesity as a disease: A white paper on evidence and arguments commissioned by the council of the obesity society. **Obesity**, v. 16, n. 6, p. 1161–1177, 2008.
- ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **The Biochemical journal**, v. 154, n. 3, p. 689–700, 1976.
- ARO, C. E. P. et al. Effects of high intensity interval training versus moderate intensity continuous training on the reduction of oxidative stress in type 2 diabetic adult patients: CAT. **Medwave**, v. 15, n. 7, p. 1–13, 2015.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation : Production , Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.
- BARAIBAR, M. A. et al. Protein Oxidative Damage at the Crossroads of Cellular Senescence , Aging , and Age-Related Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BECK-NIELSEN, H. The role of glycogen synthase in the development of hyperglycemia in type 2 diabetes –“To store or not to store glucose, that”'s the question’. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 28, p. 635–644, 2012.
- BERGER, P.; LEITNER, N. K. V. E. L.; DORE, M. Ozone and hydrozyl radicals induced oxidation of glycine. **Wat. Res.**, v. 33, n. 2, p. 433–441, 1998.
- BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, v. 128, n. 3, p. 617–630, 1972.
- BRADY, P. S.; BRADY, L. J.; ULLREY, D. E. Selenium, Vitamin E and the Response to Swimming Stress in the Rat. **The Journal of Nutrition**, v. 109, p. 1103–1109, 1979.
- BRASIL. **Lei nº 11.794/2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.**
- BREWER, A. C. et al. Reductive stress linked to small HSPs, G6PD, and Nrf2 pathways in heart disease. **Antioxid. Redox Signaling**, v. 18, n. 9, p. 1114–1127, 2013.
- BROOKS, G. A.; MERCIER, J. Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the “crossover” concept. **J Appl Physiol (1985)**, v. 76, n. 6, p. 2253–2261, 1994.

BURGOMASTER, K. A. et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 1, p. 151–160, 2008.

CAIN, D. F.; DAVIES, R. E. Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 8, n. 5, p. 361–366, 1962.

CALABRESE, E. J. Converging concepts: Adaptive response , preconditioning , and the Yerkes – Dodson Law are manifestations of hormesis. **Ageing Res Rev**, v. 7, p. 8–20, 2008.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports (Washington, D.C. : 1974)**, v. 100, n. 2, p. 126–31, 1985.

CEPERUELO-MALLAFRÉ, V. et al. Adipose tissue glycogen accumulation is associated with obesity-linked inflammation in humans. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 1, p. 5–18, 2016.

CHENG, Z.; ALMEIDA, F. A. Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity. **Cell Cycle**, v. 13, n. 6, p. 890–897, 2014.

CHOI, J.; JOSEPH, L.; PILOTE, L. Obesity and C-reactive protein in various populations: A systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews**, v. 14, n. 3, p. 232–244, 2013.

CHRISTE, M. et al. Obesity Affects Mitochondrial Citrate Synthase in Human Omental Adipose Tissue. **ISRN Obesity**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

COLL, A. P.; FAROOQI, I. S.; O’RAHILLY, S. The Hormonal Control of Food Intake. **Cell**, v. 129, n. 2, p. 251–262, 2007.

COMMONER, B.; TOWNSEND, J.; PAKE, G. E. Free Radicals in Biological Materials. **Nature**, v. 174, n. 4432, p. 689–691, 1954.

CORI, C. F.; CORI, G. T. The influence of epinephrine on the carbohydrate metabolism of fasting rats, with a note on new formation of carbohydrates. **J. Biol. Chem.**, v. 79, p. 309–319, 1928.

COZAR, A. et al. Plastic debris in the open ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 28, p. 10239–10244, 2014.

DE FEO, P. Is high-intensity exercise better than moderate-intensity exercise for weight loss? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 11, p. 1037–1042, 2013.

DILLARD, C. et al. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. **JApplPhysiol**, v. 45, p. 927–932, 1978.

FERREIRA, A. L. A. ; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007.

FISCHER, J. C. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, v. 153, n. 1, p. 23–36, 1985.

FISHER-WELLMAN, K. H. et al. Mitochondrial respiratory capacity and content are normal in young insulin-resistant obese humans. **Diabetes**, v. 63, n. 1, p. 132–141, 2014.

FISKE, C. H. The nature of the “inorganic phosphate” in voluntary muscle. **Science**, v. 65, n. 1686, p. 401–404, 1927.

- FLIER, J. S. et al. Severely Impaired Adipsin Expression in Genetic and Acquired Obesity. **Science**, v. 237, p. 405–408, 1987.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 0, n. 0, p. 192–203, 2007.
- GIBALA, M. J. et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. **The Journal of physiology**, v. 575, n. Pt 3, p. 901–911, 2006.
- GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17034, p. 1–18, 15 jun. 2017.
- GOTO, C. et al. Effect of Different Intensities of Exercise on Endothelium-dependent Vasodilatation in Humans: Role of Endothelium-dependent Nitric Oxide and Oxidative Stress. **Circulation**, v. 108, p. 530–535, 2003.
- HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens . Damage to DNA by reactive oxygen , chlorine and nitrogen species : measurement , mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Research**, v. 443, p. 37–52, 1999.
- HARMAN, D. Free Radical Theory of Aging: Consequences of Mitochondrial Aging. **Age**, v. 6, p. 86–94, 1983.
- HASKELL, W. L. et al. Physical activity and public health: Updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1423–1434, 2007.
- HO, Y.-H. et al. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. **Journal of biomedical science**, v. 22, p. 46, 2015.
- HOLLOSZY, J. O.; BOOTH, F. W. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. **Annu Rev Physiol**, v. 38, p. 273–291, 1976.
- HONDA, T. et al. Sedentary bout durations and metabolic syndrome among working adults: a prospective cohort study. **BMC Public Health**, v. 16, n. 1, p. 888, 2016.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : Direct Role in Obesity-Linked Insulin resistance. **Science**, v. 259, p. 87–91, 1993.
- HUANG, C. et al. Obesity-Related Oxidative Stress : the Impact of Physical Activity and Diet Manipulation. **Sports Medicine - open**, v. 1, n. 32, p. 1–12, 2015.
- HUBERT, H. B. et al. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26- year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 67, n. 5, p. 968–977, 1983.
- INTERNATIONAL SOCIETY FOR PHYSICAL ACTIVITY AND HEALTH. **1st Physical Activity Almanac: The Global Observatory for Physical Activity - GoPA**. [s.l: s.n.].
- JAKICIC, J. M. et al. Appropriate Intervention Strategies for Weight Loss and Prevention of Weight Regain for Adults. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 33, n. 12, p. 2145–2156, 2001.
- JENSEN, J. et al. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 2 DEC, n. December, p. 1–11, 2011.
- JOHNSON, A. M. F.; OLEFSKY, J. M. The origins and drivers of insulin resistance. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 673–684, 2013.

- JUNG, R. T. Obesity as a Disease. **British Medical Bulletin**, v. 53, n. 2, p. 307–321, 1997.
- KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 4, p. 473–481, 2000.
- KAYAMA, Y. et al. Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25234–25263, 2015.
- KEANEY, J. F. et al. Obesity and systemic oxidative stress: Clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 3, p. 434–439, 2003.
- KEHRER, J. P.; KLOTZ, L.-O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical reviews in toxicology**, v. 45, n. 9, p. 765–98, 2015.
- KELLEY, D. E. et al. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. **The American journal of physiology**, v. 277, n. 6 Pt 1, p. 1130–1141, 1999.
- KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.
- LEBOVITZ, R. M. et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9782–9787, 1996.
- LEEUWENBURGH C., FIEBIG R., CHANDWANNEY R., J. L. L. Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. **The American journal of physiology**, v. 267, p. 439–445, 1994.
- LEONG, S. F. et al. Energy-Metabolising Enzymes in Brain Regions of Adult and Aging Rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1548–1556, 1981.
- LI, J.; SIEGRIST, J. Physical activity and risk of cardiovascular disease—a meta-analysis of prospective cohort studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 2, p. 391–407, 2012.
- LITTLE, J. P. et al. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 6, p. 1011–1022, 2010.
- LIU, Y.; SWEENEY, G. Adiponectin action in skeletal muscle. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 33–41, 2013.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 2, p. 265–275, 1951.
- LU, B. et al. Metabolic crosstalk: Molecular links between glycogen and lipid metabolism in obesity. **Diabetes**, v. 63, n. 9, p. 2935–2948, 2014.
- LUSHCHAK, V. I. **Oxidative Stress - environmental induction and dietary antioxidants**. Rijeka: InTech, 2012.
- MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical care (London, England)**, v. 10, n. 1, p. 208, 2006.
- MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fundamentos de Fisiologia do Exercício**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 2002.

- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of biochemistry**, v. 52, p. 711–760, 1983.
- MOHOLDT, T. et al. The higher the better? Interval training intensity in coronary heart disease. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 17, n. 5, p. 506–510, 2014.
- NARASIMHAN, M.; RAJASEKARAN, N. S. Reductive Potential - A Savior Turns Stressor in Protein Aggregation Cardiomyopathy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1852, n. 1, p. 53–60, 2015.
- NAVARRO, A. et al. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging : survival , behavior , oxidative stress , and mitochondrial electron transfer. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, p. 505–511, 2004.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.
- PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P. DE; LANCHETA JR., A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, p. 111–127, 2003.
- POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do Exercício - teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 5<sup>a</sup> ed. Barueri: Manole, 2005.
- POWERS, S. K.; RADAK, Z.; JI, L. L. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. **The Journal of Physiology**, v. 000.0, p. 1–12, 2016.
- QATANANI, M.; LAZAR, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: Many choices on the menu. **Genes and Development**, v. 21, n. 12, p. 1443–1455, 2007.
- QUINTANILHA, A. T.; PACKER, L. Vitamin E, physical exercise and tissue oxidative damage. **Ciba Found Symp**, v. 101, p. 56–69, 1983.
- REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. 1991, p. 357–363, 1994.
- RUSTIN, P. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**, v. 228, n. 1, p. 35–51, 1994.
- SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–316, 2004.
- SIITERI, P. K. Adipose tissue as a source of hormones. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, p. 277–282, 1987.
- SINDHU, S. et al. Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: Significance for metabolic inflammation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–17, 2015.
- SON, J. et al. Abdominal obesity and structure and function of the heart in healthy male Koreans. **Medicine**, v. 95, n. 39, p. 1–6, 2016.
- ST-PIERRE, J. et al. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 44784–44790, 2002.
- TERADA, S. et al. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 90, n. 6, p. 2019–2024, 2001.
- THYFAULT, J. P. et al. Impaired plasma fatty acid oxidation in extremely obese women. **American**

- journal of physiology Endocrinology and metabolism**, v. 287, p. 1076–1081, 2004.
- TOYOKUNI, S. Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 46–49, 2016.
- TREMBLAY, A. et al. Impact of exercise intensity on body fatness and skeletal muscle metabolism. **Metabolism**, v. 43, n. 7, p. 814–818, jul. 1994.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335–344, 2003.
- VELHO, G. et al. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 8, p. 1755–1761, 1996.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, n. 1967, p. 325–333, 1981.
- WHIPP, B. J.; WARD, S. A.; ROSSITER, H. B. Pulmonary O<sub>2</sub> uptake during exercise: Conflating muscular and cardiovascular responses. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 37, n. 9, p. 1574–1585, 2005.
- WHO. **Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks** World Health Organization (WHO; Geneva). [s.l: s.n.].
- WHO. **Global Status Report on Noncommunicable Diseases** World Health Organization (WHO; Geneva). [s.l: s.n.].
- WILLEY, J. Z. et al. Physical inactivity is a strong risk factor for stroke in the oldest old : Findings from a multi-ethnic population ( the Northern Manhattan Study ). v. 12, n. 2, p. 197–200, 2016.
- WONG, C.; MARWICK, T. H. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 4, n. 8, p. 436–443, 2007.
- ZELLE, D. et al. Physical inactivity: a risk factor and target for intervention in renal care. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 3, p. 152–168, 2017.