

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

**EFEITOS DE DOIS PROTOCOLOS DE TREINAMENTO
AERÓBICO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA**

ARIENE SAMPAIO SOUZA FARIAS ULBRICHT

JOINVILLE – SC

2016

ARIENE SAMPAIO SOUZA FARIAS ULBRICHT

**EFEITOS DE DOIS PROTOCOLOS DE TREINAMENTO
AERÓBICO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM 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^a Dr^a Daniela Delwing de Lima e Co-orientadora: Prof^a Dr^a Carla Werlang Coelho.

JOINVILLE - SC

2016

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

U36e Ulbricht, Ariene Sampaio Souza Farias
Efeitos de dois protocolos de treinamento aeróbico sobre parâmetros de estresse oxidativo em ratos obesos/ Ariene Sampaio Souza Farias Ulbricht; orientadora Dra. Daniela Delwing de Lima; co-orientadora Dra. Carla Werlang Coelho. – Joinville: UNIVILLE, 2016.

100 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Stress oxidativo. 2. Exercícios aeróbicos. 3. Fígado. 4. Sangue. 5. Obesidade. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Coelho, Carla Werlang (co-orient.). Título.

CDD 574.2

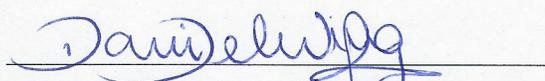
Termo de Aprovação

“Efeitos de dois Protocolos de Treinamento Aeróbico sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo em Ratos Obesos”

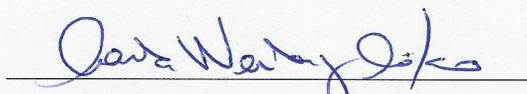
por

Ariene Sampaio Souza Farias Ulbricht

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)

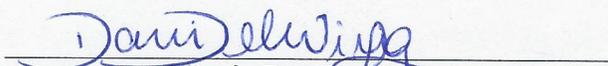


Profa. Dra. Carla Werlang Coelho
Coorientadora (UNIVILLE)

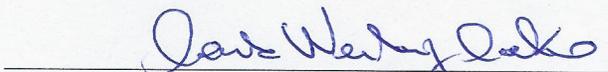


Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

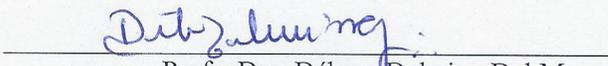
Banca Examinadora:



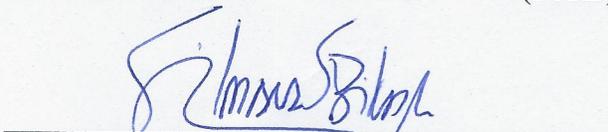
Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)



Profa. Dra. Carla Werlang Coelho
Coorientadora (UNIVILLE)



Profa. Dra. Débora Delwing Dal Magro
(FURB)



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

Joinville, 09 de dezembro de 2016

Dedico a todos que auxiliaram na execução desse trabalho.

.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer as docentes: orientadora Prof^a. Dr^a. Daniela Delwing de Lima e a co-orientadora Prof^a. Dr^a. Carla Werlang Coelho, que me proporcionaram hoje esse sentimento de aprendizado, realização e sucesso, a vocês expresseo o meu carinho e gratidão. Agradeço à toda minha família, principalmente aos meus pais, Osmar e Arilda, pelo apoio e compreensão. Ao meu esposo Gerson, que em todos os momentos esteve ao meu lado me apoiando e incentivado, minha amada irmã Pâmela, meu querido cunhado Graziani e sobrinhos queridos André, Maysa e Patrick, quero agradecer pela alegria, companhia e apoio em todos os momentos. Amo vocês. Às minhas companheiras de laboratório, Marina e Mariana: a ajuda de vocês foi essencial para o meu trabalho. Ao professor Eduardo Manoel Pereira, pela disponibilidade e apoio, ao Víctor e Bruna pelo apoio. Aos meus colegas de mestrado, especialmente a Aline e Lara (AAÍ) pelo companheirismo e amizade. A todos os professores do mestrado, pelos ensinamentos. A secretária do mestrado Débora Gesser, pela disponibilidade de sempre. Aos membros da banca pelas contribuições. A CAPES, UNIVILLE e FAPESC.

MUITO OBRIGADA!

“Inteligência é a capacidade de se adaptar à mudança”.

Stephen Hawking

RESUMO

Introdução: A obesidade é uma desordem metabólica complexa e multifatorial caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal no tecido adiposo estando associada à processo inflamatório celular e indução de estresse oxidativo. Sabe-se que o exercício físico aumenta o gasto energético corporal, bem como promove um efeito estimulador e reparador através da modulação das defesas antioxidantes endógenas.

Objetivo: Verificar os efeitos de dois protocolos de treinamento físico aeróbico (TFA) sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre a atividade das enzimas antioxidantes no sangue, fígado e músculos de ratos expostos à dieta hiperlipídica. **Materiais e**

Métodos: A amostra foi composta por ratos machos Wistar (n total = 24), com dez semanas de idade (250 ± 50 g de massa corporal). Inicialmente, os animais receberam dieta hiperlipídica (DHL) ou dieta normal (DN) durante 8 semanas. Posteriormente, associado à dieta, foram realizados os protocolos de TFA divididos em treinamento aeróbico contínuo (TC) e treinamento aeróbico intervalado de alta intensidade (HIIT), durante 9 semanas. Foram realizadas análises no sangue, fígado e músculos de danos em lipídeos, através da avaliação da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), e em proteínas, através do conteúdo total de sulfidrilas e de proteínas carboniladas; também foi avaliado a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) superóxido desmutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Os resultados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo post-hoc de Duncan, quando indicado ($p < 0,05$). **Resultados:** A DHL aumentou TBA-RS e o conteúdo de proteínas carboniladas e reduziu o conteúdo total de sulfidrilas em plasma, causando diminuição na atividade da CAT e da GSH-Px, porém não alterando a atividade da SOD em eritrócitos de ratos; já os protocolos TC e HIIT preveniram o aumento dos níveis de TBA-RS e parcialmente o aumento do conteúdo de proteínas carboniladas, bem como preveniram a redução da atividade da CAT, mas não preveniram a redução do conteúdo total de sulfidrilas e a redução da atividade da GSH-Px; somente o protocolo HIIT aumentou a atividade da SOD. Com relação ao fígado, os resultados mostraram que a DHL não alterou TBA-RS, conteúdo

total de sulfidrilas e a atividade da SOD, mas promoveu o aumento do conteúdo de proteínas carboniladas e da CAT, e diminuiu a atividade da GSH-Px; ambos os protocolos de TFA preveniram o aumento no conteúdo de proteínas carboniladas e o protocolo TC preveniu a alteração na atividade da CAT, enquanto o protocolo HIIT não preveniu esta alteração. Ambos os protocolos não preveniram a diminuição na atividade da GSH-Px. Considerando o músculo esquelético (sóleo e plantar), os resultados mostraram que a DHL não alterou TBA-RS e o conteúdo total de sulfidrilas nos músculos sóleo e plantar, porém, em relação aos protocolos de TFA, ambos causaram uma diminuição significativa nos níveis de TBA-RS no músculo plantar quando comparado com o grupo DHL. A DHL não alterou conteúdo total de sulfidrilas nos músculos sóleo e plantar, mas ambos os protocolos de TFA conseguiram aumentar o conteúdo total de sulfidrilas no músculo sóleo, e o protocolo de TC aumentou o conteúdo total de sulfidrilas também no músculo plantar. A DHL não alterou o conteúdo de proteínas carboniladas em ambos os músculos, quando comparado com o grupo controle (DN) bem como o protocolo HIIT, porém o TC teve a capacidade de diminuir a carbonilação de proteínas comparado com o grupo DHL. A DHL não alterou a atividade da SOD no músculo sóleo, mas reduziu significativamente a atividade da enzima no músculo plantar. O TC aumentou a atividade da SOD no músculo sóleo. Ambos os protocolos foram capazes de reverter a diminuição da atividade da SOD causada pela DHL no músculo plantar. A DHL aumentou significativamente a atividade da CAT no músculo sóleo, mas não alterou a atividade da enzima no músculo plantar. O protocolo HIIT impediu a alteração no músculo sóleo e ambos os protocolos aumentaram significativamente a atividade da CAT no músculo plantar. A DHL reduziu a atividade da enzima GSH-Px em ambos os músculos. O protocolo TC impediu essa redução e o protocolo HIIT impediu parcialmente, no músculo sóleo. Considerando o músculo plantar, enquanto o protocolo TC não impediu a redução da atividade da GSH-Px, o protocolo HIIT impediu parcialmente a redução. **Conclusão:** Conclui-se que a DHL causou estresse oxidativo no sangue, fígado e músculo esquelético de ratos, e que ambos os protocolos de TFA (TC e HIIT) foram capazes de prevenir a maior parte das alterações causadas pela DHL sobre os parâmetros de estresse oxidativo testados.

Palavras-chave: protocolos de treinamento físico aeróbio, estresse oxidativo, sangue, fígado, músculos esqueléticos.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a complex and multifactorial metabolic disorder characterized by the accumulation of body fat in adipose tissue and is associated with cell inflammation and oxidative stress induction. It is known that exercise increases the body energy expenditure and promotes a stimulating and refreshing effect through modulation of endogenous antioxidant defenses. **Objective:** To investigate the effects of two aerobic exercise training protocols (TFA) on oxidative stress parameters and on the activity of antioxidant enzymes in the blood, liver and muscles of rats exposed to high fat diet. **Materials and Methods:** The sample consisted of male Wistar rats (n = 24), with ten weeks of age (250 ± 50 g body weight). Initially, the animals received high fat diet (LDH) or normal diet (ND) for 8 weeks. Subsequently, associated with diet, TFA protocols divided into continuous aerobic training (CT) and interval aerobic training high intensity (HIIT) were performed for 9 weeks. Blood analyzes were performed, liver damage and muscle lipid through thiobarbituric acid reactive substances to (TBARS) and protein through the entire contents of sulfhydryl and protein carbonyls; were also evaluated the activity of enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px). The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) of a route, followed by post-hoc Duncan, as indicated ($p < 0.05$). We evaluated the effects of two aerobic exercise training protocols (AETP), the moderate-intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT), on the alterations caused by high-fat diet (HFD) on oxidative stress parameters in the blood, liver and skeletal muscles of rats. First of all, animals received 8 weeks of HFD or normal-diet (ND); then, plus more 9 weeks of HFD or ND and two AETP. **Results:** DHL increased TBARS and content of protein carbonyls and reduced the total content sulfidrillas in plasma, causing decrease in the activity of CAT and GSH-Px, but not altering the activity of SOD in rat erythrocytes; since the TC protocols and HIIT prevented the increase in TBARS levels and partly increasing the content of carbonyl protein and previniram reducing CAT activity but did not prevent the reduction of total content of sulfhydryl and reduced activity GSH-Px; only the HIIT

protocol increased the activity of SOD. With respect to the liver, the results showed that DHL did not change TBARS, the total sulfhydryl content and SOD activity, but increased contents of carbonyls and CAT activity, and decreased activity of GSH-Px; both TFA protocols prevented the increase in the content of protein carbonyls and CT protocol prevented the change in CAT activity, while the HIIT protocol did not prevent this change. Both protocols did not prevent the decrease in the activity of GSH-Px. Whereas skeletal muscle (soleus and plant), the results showed that DHL did not change TBARS and the total content of sulfhydryl in the soleus and plantaris muscles, however, in relation to the TFA protocols, both caused a significant decrease in the levels of TBARS the plantar muscle when compared to the DHL group. DHL did not change the total sulfhydryl content in the soleus and plantaris muscles, but both TFA protocols were able to increase the total content of sulfhydryl in the soleus muscle, and the CT protocol increased the total content of sulfhydryl also in the plantaris muscle. DHL did not alter the content of carbonylated protein in both muscles, compared with the control group (DN) and HIIT protocol, but TC was able to reduce protein carbonylation compared DHL group. DHL did not alter the activity of SOD in the soleus muscle, but significantly reduced the enzyme activity in muscle plant. TC increased SOD activity in the soleus muscle. Both protocols were able to reverse the reduction in SOD activity caused by DHL in the plantar muscle. DHL significantly increased CAT activity in the soleus muscle, but did not alter the enzyme activity in muscle plantaris. HIIT protocol prevented the change in the soleus muscle and both protocols significantly increased CAT activity in the plantar muscle. DHL has reduced the activity of GSH-Px enzyme in both muscles. The CT protocol prevented this reduction and the HIIT protocol prevented partially in the soleus muscle. Considering the plantaris muscle, while the CT protocol did not prevent the reduction of the activity of GSH-Px, HIIT protocol partially prevented the reduction. **Conclusion:** We conclude that DHL caused oxidative stress in the blood, liver and skeletal muscle of rats, and both TFA protocols (TC and HIIT) were able to prevent most of the changes caused by DHL on the parameters of oxidative stress tested.

Keywords: Aerobic exercise training protocols, oxidative stress, blood, liver, skeletal muscles.

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Gráfico1: Estimativa da prevalência do sobrepeso e obesidade em vários países	28
Figura 1: Modelo de Lewis	33
Figura 2: Geração de ERO a partir da redução do oxigênio	35
Figura 3: Reação de Haber- Weiss	36
Figura 4: Reação de Fenton	37
Figura 5: Formação do peroxinitrito (ONOO)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação do sobrepeso e da obesidade	21
Tabela 2: Espécies reativas do nitrogênio	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SM	Síndrome Metabólica
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM	diabetes <i>melittus</i>
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
TFA	Treinamento Físico Aeróbico
TC	Treinamento Contínuo
HIIT	<i>High Intensivy Interval Training</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Ânion Peroxinitrito
LOOH	Hidroperóxidos
LOO*	Radical Peroxila
RL	Radical Livre
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O ₂	Oxigênio
O ₂ •-	Radical Superóxido
OH•	Radical Hidroxil
EO	Estresse Oxidativo
MDA	Malondialdeído

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
CAT	Catalase
GSH	Glutathiona
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
GSSG	Glutathiona Oxidada
PAI-1	Inibidor do Ativador do Plasminogênio
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
IL-6	Interleucina 6

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Objetivos.....	20
1.1.1 Objetivo Geral	20
1.1.2 Objetivos Específicos	20
1.2 Artigo Científico	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Reações Químicas para a Evolução.....	22
2.2 Sedentarismo e Obesidade	22
2.2.1 Obesidade.....	22
2.2.2 Leptina	24
2.2.3 Angiotensina / Inibidor do ativador do Plasminogênio (PAI-1)	24
2.2.4 Factor de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)	25
2.2.5 Interleucina 6 (IL-6)	25
2.2.6 Obesidade e qualidade de vida.....	26
2.2.7 Sedentarismo	28
2.3 Exercício Físico	29
2.3.1 Exercício Aeróbico Intervalado e Exercício Aeróbico Contínuo	31
2.3.2 Exercício, Radicais Livres e o Balanço Redox	32
2.4 Radicais Livres (RL) e Estresse Oxidativo (EO)	33
3 INTERDISCIPLINARIDADE.....	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Animais e Tratamento.....	48
4.2 Amostra	48
4.3 Desenho Experimental.....	48

4.3.1	Indução de Obesidade	48
4.3.2	Formação dos Grupos Experimentais	49
4.4	Protocolos de Treinamento Aeróbico.....	49
4.4.1	Teste de tolerância ao esforço máximo.....	50
4.5	Protocolo Experimental – Amostras.....	50
4.6	Preparação dos Eritrócitos e do Plasma:.....	50
4.7	Preparação do Tecido.....	51
4.7.1	TBA-RS	51
4.7.2	Proteínas Carboniladas.....	52
4.7.3	Conteúdo Total de Sulfidrilas	52
4.7.4	Catalase (CAT).....	53
4.7.5	Glutationa Peroxidase (GSH-PX).....	53
4.7.6	Superóxido Dismutase (SOD)	53
4.7.7	Dosagem de Proteínas.....	54
4.8	Análise Estatística	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
5.1	ARTIGO 1: EFFECTS OF TWO AEROBIC EXERCISE TRAINING PROTOCOLS ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN BLOOD AND LIVER OF OBESE RATS.....	55
5.2	ARTIGO 2: EFFECTS OF TWO AEROBIC EXERCISE TRAINING PROTOCOLS ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN SKELETAL MUSCLE OF OBESE RATS	75
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
7	REFERÊNCIAS.....	93

1. INTRODUÇÃO

Estudos mostram que a alimentação hiperlipídica traz numerosos danos ao organismo, colaborando para o surgimento de doenças como a obesidade, cuja etiologia se dá pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal. A obesidade é considerada uma doença crônica, poligênica e não transmissível e quando aliada ao sedentarismo induz a comorbidades diversas e aumenta significativamente o risco para as doenças cardiovasculares (DCV), para o diabetes *mellitus* tipo 2 e para a Síndrome metabólica, elevando também os índices de mortalidade nestas condições (BERTOLUCI *et al*, 2014; PAPADAKIS *et al*, 2015; WHO, 2011).

Os fatores que contribuem para esse problema são o enquadramento da população em três inserções relevantes de mudanças de comportamento. Em primeiro lugar, as mudanças no estilo de vida nos países com uma economia em crescimento, com pessoas que vivem mais em centros urbanos, em segundo lugar, uma população que vem modificando seu padrão alimentar, o tornando mais industrializado, rico em gorduras e pobre em nutrientes essenciais ao organismo, e por último, uma população que faz pouco ou nenhum exercício físico devido a mecanização e facilitação dos bens oferecidos (*International Food Policy Research Institute/ IFPRI*, 2016; BARRY *et al*, 1998).

Atualmente a obesidade é considerada uma pandemia mundial e um grande problema de saúde pública, cujo desafio global é alarmante, uma vez que está presente tanto em países desenvolvidos como nos que estão em desenvolvimento e conseqüentemente colocando os marcos da nutrição global em risco. No Brasil, o último relatório do Ministério da Saúde mostra que 52,2 % da população está acima do peso, e deste percentual 17,9% estão obesos (BRASIL- MS, 2015). As principais comorbidades induzidas pela obesidade, como as doenças cardiovasculares que incluem a hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e aterosclerose, bem como o diabetes *mellitus* tipo 2 elevam os índices de mal nutrição e suas conseqüências deletérias tanto para as sociedades quanto para os indivíduos (KOHLMANN, 2002; POIRIER *et al*, 2006).

Os gastos anuais de um obeso se elevam em média 8% com assistência médica em países desenvolvidos, como é o caso dos Estados Unidos e da China, e aliado à uma comorbidade como o diabetes *mellitus* tipo 2, representa 16,3% deste gasto anual para

quem tem a condição. O ônus dessas condições de saúde-doença recai sobre toda a população, mesmo que não seja percebida diretamente (International Food Policy Research Institute, 2016; OCDE, 2015).

Os danos que a obesidade e suas comorbidades causam a nível celular e, conseqüentemente, sistêmico são advindos de alterações no metabolismo energético, o qual promove a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam injúria a toda estrutura celular. Pelo fato dessas doenças possuírem longo período de latência e tempo de evolução prolongado, ocorre a geração excessiva de radicais livres (RL) que resultam em estresse oxidativo (MANCINI *et al*, 2010). Os RL, como por exemplo, o radical hidroxil (OH•) pode agir no ácido desoxirribonucleico (DNA), causando oxidação de bases purínicas e pirimidínicas, bem como fragmentação da desoxirribose; e na membrana celular, estimulando a peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados, com produção de hidroxiperóxidos lipídicos, aldeídos e isoprostanos (AYALA *et al*, 2014). O malondialdeído (MDA) é um desses produtos secundários da peroxidação lipídica que, por ser um produto estável, pode ser utilizado como medida cumulativa desse processo. Esse processo químico celular desestabilizado, devido ao aumento da gordura corporal, está associado ao excesso de inflamação, provocando um desequilíbrio oxidativo e comprometendo a saúde do indivíduo (ESTADELLA *et al*, 2013; NAUDI *et al*, 2012).

Estudos mostram que múltiplas terapias têm sido sugeridas e utilizadas para reduzir os resultados nocivos da obesidade, entre elas, a mudança no estilo de vida, através de uma dieta equilibrada e da prática de atividade física. Diversas pesquisas sugerem que o exercício físico regular constitui estratégia indispensável e fundamental no tratamento da obesidade, uma vez que garante aumento do gasto energético, proporciona diminuição da gordura e aumento de massa magra, gerando dessa forma, efeito cascata positivo sobre o equilíbrio ponderal. Além disso, ainda minimiza os efeitos deletérios do estresse oxidativo à nível celular e conseqüentemente sistêmico (BENITE *et al*, 2015; BRAGA, 2004; BROWN, 2015; FINUCANE *et al*, 2011).

Pesquisas que contemplam modelos de obesidade experimental, como a dietoterapia hiperlipídica, associados ao exercício físico, tem sido largamente empregadas, visto que se considera hoje que o exercício físico apropriado, na maioria dos casos como terapia não medicamentosa e não deletéria, é capaz de evitar e tratar a

obesidade e suas complicações físicas e metabólico-celulares (PINHO *et al*, 2010; PIMENTA *et al*, 2015; LUZ, 2013). Partindo desse pressuposto, a pesquisa de interesse teve como objetivo investigar os efeitos gerados por dois protocolos de treinamento físico aeróbico, o intervalado em alta intensidade e o contínuo em intensidade moderada, sobre parâmetros de estresse oxidativo em ratos submetidos à dieta hiperlipídica, a fim de contribuir para a escolha de protocolos de treinamento físico aeróbico mais efetivos para a prevenção e tratamento da obesidade, promovendo uma melhor qualidade de vida às pessoas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos de dois protocolos de treinamento físico aeróbico (TFA) sobre parâmetros de estresse oxidativo no sangue, fígado e músculos de ratos expostos à dieta hiperlipídica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar a influência do protocolo de TFA intervalado em alta intensidade (HIIT) sobre a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e proteínas carboniladas em plasma, fígado e músculos (sóleo e plantar) de ratos submetidos à dieta hiperlipídica;
- Verificar a influência do protocolo de TFA contínuo em intensidade moderada (TC) sobre o TBA-RS, conteúdo total de sulfidrilas e proteínas carboniladas em plasma, fígado e músculos (sóleo e plantar) de ratos submetidos à dieta hiperlipídica;

- Verificar a influência do protocolo de TFA intervalado em alta intensidade (HIIT) sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos, fígado e músculos (sóleo e plantar) de ratos submetidos à dieta hiperlipídica;
- Verificar a influência do protocolo de TFA contínuo em intensidade moderada (TC) sobre a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos, fígado e músculos (sóleo e plantar) de ratos submetidos à dieta hiperlipídica.

1.2 Artigo Científico

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados em forma de dois artigos científicos que foram submetidos à publicação em revista específica e estão dispostos no Capítulo 5.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reações Químicas para a Evolução

A vida com a sua bela forma tem a sua origem, e é sustentada por uma classe de reações químicas, cuja excelente característica é a sua natureza incontrolável. Além disso, a extensão e função de vida evoluiu em paralelo com a capacidade dos organismos de lidar com fatores prejudiciais (HARMAN, 2003)

2.2 Sedentarismo e Obesidade

2.2.1 Obesidade

A globalização, consumismo, falta de tempo e estresse, tem levado a sociedade ao sedentarismo e obesidade. A obesidade é o resultado de distúrbios prolongados no equilíbrio energético em que a ingestão diária de energia excede o seu consumo diário necessário. O equilíbrio energético é modulado por muitos fatores, incluindo a taxa metabólica, o apetite, a dieta e a atividade física. Embora esses fatores sejam influenciados por traços genéticos, o aumento na prevalência da obesidade nas últimas décadas não pode ser explicado por alterações apenas nos genes humanos, sendo mais frequentemente atribuído a mudanças ambientais que promovem a ingestão excessiva de comida e desestimulam a atividade física (COUTINHO, 2006).

De acordo com a literatura, a obesidade é considerada uma doença poligênica e multifatorial, onde ocorrem interações de susceptibilidade genética e outras variáveis dietéticas, ambientais e metabólicas (BELISSARI, 2016).

A obesidade é uma condição crônica, caracterizada por um excesso de gordura corporal. É mais frequentemente definida pelo índice de massa corporal (IMC), uma fórmula matemática que é altamente correlacionada com a gordura corporal. O IMC é

obtido por meio da divisão da massa corporal pela estatura ao quadrado. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, um IMC entre 25 e 30 Kg/m² é classificado como sobrepeso, e um IMC acima de 30 Kg/m², é classificado como obesidade (OMS, 2003).

Quando ocorre um desequilíbrio energético entre ingestão de alimentos pobres em nutrientes e com altos níveis de gorduras e açúcares e o gasto energético é reduzido, resulta na obesidade (CURI et al, 2002).

Na elevação do IMC, os sistemas respiratório, vascular e metabólico sofrem estresse devido à uma carga de trabalho maior do que a habitual, e isto induz a uma diminuição da reserva fisiológica com alterações significativas/negativas no equilíbrio e homeostase do organismo (COUTINHO, 2006 e OMS, 2003). Abaixo a classificação do IMC para adultos.

Tabela 1: Classificação do sobrepeso e da obesidade.

Classificação	IMC (Kg/m²)
Eutrófico	18,5 – 24,9
Sobrepeso	≥25
Pré-obesidade	25 – 29,99
Obeso	≥ 30
Obeso classe 1	30 – 34,99
Obeso classe 2	35 – 39,99
Obeso classe 3	≥40

Fonte: OMS (2013)

A obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo corporal, que compõe um depósito de triacilglicerol e ácidos graxos livres. A composição do tecido adiposo apresenta a seguinte estrutura: adipócitos maduros, fibroblastos, células endoteliais, pré-adipócitos, macrófagos, vasos sanguíneos, células T e inervação, que levam conseqüentemente ao ganho de massa corporal e aumento do IMC (KUMAR et al., 2013).

O tecido adiposo não é apenas um sítio de armazenamento de triglicérides, mas

um partícipe da homeostase e de reações biológicas específicas como a emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes (DRISKELL *et al*, 2014).

Entre as proteínas sinalizadoras, estão as adipocinas, e algumas delas possuem funções inflamatórias tais como a leptina, o ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6). Esses marcadores fisiológicos de inflamação sistêmica subclínica levam à produção de ERO, gerando o estresse oxidativo (BELISSARI, 2016).

2.2.2 Leptina

A leptina circula no plasma e está ligada à proteínas plasmáticas, e acessa o SNC por difusão. O excesso de produção dessas citocinas no obeso está relacionado a diminuição de receptores e/ou falta de sensibilidade à leptina, prejudicando o controle adequado da ingestão alimentar e do gasto energético (BREWIS, 2011; KUMAR *et al*, 2013).

Dados da literatura mostram que o principal local de produção de leptina é no adipócito, onde também ocorre a produção da angiotensina 2, que também está alterada na obesidade, elevando a pressão arterial. Essa produção excessiva de leptina e de angiotensina 2, que ocorre na obesidade, causa disfunção endotelial por diminuir a disponibilidade de óxido nítrico, e conseqüentemente por serem geradores de radicais livres de oxigênio que provocam danos ao tecido vascular (MAYER, 2000).

2.2.3 Angiotensina / Inibidor do ativador do Plasminogênio (PAI-1)

O angiotensinogênio desempenha um papel importante na regulação e fluxo de ácidos graxos, está expresso em vários tipos de células no tecido adiposo, porém sua secreção é mais elevada no tecido visceral do que no tecido subcutâneo, e sua correlação positiva com a síndrome metabólica ocorre pela promoção de resistência à insulina

quando tem-se alta concentração de PAI-1 e, conseqüentemente, devido sua associação pró-inflamatória (CASAS *et al*, 2016; KAUR *et al*, 2010).

2.2.4 Factor de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)

O TNF- α está envolvido na resposta inflamatória sistêmica, sua produção se dá principalmente por monócitos, linfócitos, tecido adiposo e muscular. O TNF- α nuclear ativa fator kB (NF- κ B), o que leva ao aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais e células do músculo liso vascular, o que resulta em um estado inflamatório no tecido adiposo, promovendo disfunção endotelial e causando aterogênese. Também apresenta produção irregular na patogênese da síndrome metabólica, e está associado com o desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes e obesidade (SAIEDULLAH, 2016).

2.2.5 Interleucina 6 (IL-6)

É definida como uma citocina pró-inflamatória e sua produção se dá por macrófagos, adipócitos que são células do sistema imunitário, também pelos fibroblastos, células endoteliais músculo – esqueléticas. A IL-6 influencia a tolerância à glicose através da inibição da glicogênese (CASAS *et al*, 2016).

Considerando as informações acima, a presença de inflamação crônica aumenta a predisposição à diversas doenças como o diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica, além de abreviar a competência imunológica e induzir a riscos metabólicos e cardiovasculares (BRASIL- MS, 2014; SILVÉRIO *et al*, 2015).

Nas doenças arteriais coronarianas e na inflamação vascular ocorre uma reação inflamatória e proliferativa na parede vascular, elevando a secreção de citocinas pró-inflamatórias, e quando em excesso esses fatores danificam o endotélio e diminuem a concentração do óxido nítrico celular, prejudicando a vasodilatação do endotélio, levando a apoptose destas células e a injúria endotelial. Essas citocinas são secretadas em

quantidade superior aos níveis orgânico-funcionais em obesos, causando injúria a todo o sistema (KUMAR *et al*, 2013).

Estudos como o *Framingham Heart Study*, *Nurses Health Study*, colaboram em seus resultados com a associação positiva entre obesidade e diversas comorbidades, provando que a dieta hipercalórica com uma alimentação rica em lipídeos traz numerosos danos ao organismo, e sua associação com o sedentarismo aumenta significativamente os fatores de risco para diversas doenças crônicas não transmissíveis, incluindo doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, dislipidemia, metabólicas como DM tipo 2, além de uma correlação positiva entre obesidade e a síndrome da apnéia obstrutiva do sono, problemas osteoarticulares como artrite e alguns tipos de neoplasias (SILVÈRIO *et al*, 2015; PACK, 1994).

Inúmeras são as desordens biológicas negativas da obesidade, e se somam a elas também as causas e consequências psicológicas, emocionais e sociais, porque o excesso de peso pode desencadear doenças e transtornos como a depressão, ansiedade e compulsões alimentares de diversas ordens, entre elas o aumento do apetite que é regido pelo fator psicológico, contrário á fome que é regida pela necessidade do organismo. (BOLNER, 2006; SASSI, 2010; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

2.2.6 Obesidade e qualidade de vida

Nas últimas décadas houve diversas transformações políticas, econômicas, sociais e culturais que evidenciam transformações no modo de vida da população. Rápida transição demográfica, epidemiológica e nutricional, apresentando como consequência, mudanças importantes no padrão de saúde e consumo alimentar da população mundial.

De acordo com Viuniski (2003), a diminuição da qualidade de vida das pessoas e o risco de uma morte prematura tem sido o saldo da obesidade mundial, sendo computada como a principal causa de morte evitável, assim como a associação com o uso do tabaco, e por se tratar de uma doença crônica, uma vez obeso, mesmo que emagreça, tornar-se-á potencialmente obeso para sempre (OMS, 2015). Dados apontam que a prevalência da

obesidade, associada a outras comorbidades, está aumentando rapidamente e esse risco está intimamente relacionado a adoção de um estilo de vida sedentário (Gómez-Cabello *et al.*, 2012).

O Brasil vem enfrentando um aumento expressivo do sobrepeso e da obesidade em todas as faixas etárias. Dados do MS indicam que o excesso de peso acomete um em cada dois adultos e uma em cada três crianças, associado á obesidade há o aumento dos fatores de risco para doenças crônicas, como hipertensão arterial e alguns tipos de câncer, sendo que estas doenças estão entre as principais causas de morte entre adultos e respondem por 72% dos óbitos no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; PROENÇA, 2010; IBGE, 2013).

Além do índice de mortalidade alto, adultos obesos apresentam mais internações hospitalares por ano, mais consultas ambulatoriais, maiores custos de medicamentos sob prescrição e pior qualidade de vida relacionada à saúde, em comparação com os adultos de peso normal (SASSI, 2010).

Dados mostram que no Brasil, caracterizado por ser um país em desenvolvimento, a obesidade também está se tornando um problema de saúde pública. Dados da Vigitel (2015) relatam que a taxa de obesidade é de 17,9% e a relação é maior entre homens com 56,5% versus 49,1% das mulheres, e que a obesidade, o excesso de peso e as doenças crônicas correlacionadas foram responsáveis por um gasto de U\$ 221 milhões no ano de 2010 (BAHIA *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Bolner (2006) mostram que quase 5 milhões de adultos dos Estados Unidos da América (EUA) usaram medicamentos prescritos para a perda de peso já nos anos de 1996 a 1998, e somente na última década a prevalência de obesidade no país aumentou cerca de 30,5%.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reúne informações onde se mostra que quase 10% dos orçamentos de saúde em países ocidentais estão hoje relacionados à obesidade. Tanto índices econômicos, psicossociais e de saúde reafirmam a problemática: caminhamos para uma epidemia assustadora no século XXI (OMS, 2013).

O Gráfico 1 aponta a estimativa da prevalência geral da obesidade (IMC acima de 30 Kg/m²) em adultos de ambos os sexos em vários países, mostrando a estimativa para 2025.

Obesity in 2025

Percentage of population estimated to be obese in nine years

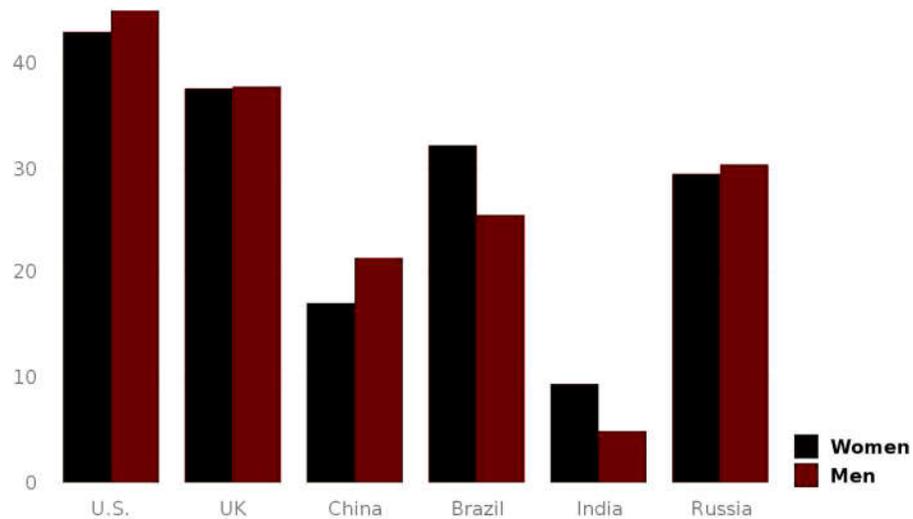


Gráfico1: Estimativa da prevalência do sobrepeso e da obesidade em vários países.
Fonte: *The Lancet* (2016).

Os dados mostram que a nível mundial as perspectivas são preocupantes, pois segundo a OMS, a estimativa para 2030 é de que o sobrepeso e a obesidade afete mais de três bilhões de pessoas no mundo (OMS, 2013).

2.2.7 Sedentarismo

Baseado na constatação de que grande parte das comorbidades e mortes se relacionam com a maneira como as pessoas vivem, conclui-se que elas estão, sobretudo, ligadas aos hábitos alimentares e níveis de atividade física, entre outros fatores (OMS, 2003; INCA, 2004).

No mundo desenvolvido, o estilo de vida sedentário se torna cada vez mais comum, e está relacionado àquelas atividades que são realizadas na posição deitada ou sentada, que não elevam o gasto energético acima dos níveis de repouso.

Atividades do dia-a-dia que proporcionam o sentar ou deitar como ao utilizar aparelhos eletrônicos incluindo televisão, vídeo-game, computador, e ainda, com controle remoto que induz ao uso sentado ou deitado, bem como alimentar-se na posição sentada, ou mesmo o uso de meios de transporte incluindo trem, metrô, carro ou ônibus, induzem a não atividade física necessária para uma boa qualidade de vida. (AMORIM e FARIA, 2012; GÓMEZ-CABELLO *et al*, 2012).

De acordo com o IBGE (2013), no Brasil, a proporção de adultos classificados como insuficientemente ativos concentrou-se em 46 % na faixa etária de 25 a 60 anos ou mais (IBGE, 2013; OWEN *et al*, 2010).

O sedentarismo é considerado o quarto maior fator de risco de mortalidade global (VIGITEL, 2014). Também é considerado um fator preponderante para o surgimento e a manutenção da obesidade e de suas comorbidades, uma vez que essa associação deletéria causa danos a nível celular através da produção de RL que são moléculas altamente reativas que contém oxigênio e que em excesso levam ao estresse oxidativo (SALVADOR; HENRIQUES, 2004; BARREIROS *et al*, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

2.3 Exercício Físico

A globalização, consumismo, falta de tempo e estresse, tem levado a sociedade ao sedentarismo e obesidade.

O exercício físico torna-se uma atividade importante para prevenir a obesidade, uma vez que induz a elevação do metabolismo basal pelo efeito depletor de energia. O exercício físico pode ser classificado de modo geral, em intervalado ou contínuo (FOX, 2006); (SIJIE *et al.*, 2012).

A prática de atividades físicas é um fator fundamental de modo a contribuir para uma condição de vida saudável. É importante estabelecer uma rotina de exercícios como condição fundamental no planejamento das atividades diárias. Ainda, segundo definição da Estratégia Global para Dieta, Atividade Física e Saúde - OMS:

“(...) é recomendado que indivíduos se envolvam em níveis adequados de atividade física e que esse comportamento seja mantido para a vida toda. Diferentes tipos, frequência e duração de atividade física são requeridos para diferentes resultados de saúde. Pelo menos 30 minutos de atividade física regular, de intensidade moderada, na maioria dos dias da semana, reduz o risco de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer de cólon e mama.” BRASIL (2003 p. 103).

Embora muitas publicações utilizem os termos “exercício físico” e “atividade física” como sinônimos, é importante salientar que existe uma diferença significativa entre estes conceitos (MURADÁS, 2012).

Caspersen *et al.* (1985), define atividade física “qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto de energia”. Sabe-se que qualquer movimento realizado por um indivíduo gera gasto calórico. Portanto, atividades domésticas ou de lazer, por exemplo, são consideradas atividades físicas, pois envolvem movimento corporal e conseqüentemente gasto calórico maior que os níveis de repouso.

Já exercício físico, é considerado uma subcategoria da atividade física. Segundo Malloy-Diniz (2013), pode-se definir exercício físico como “toda forma de atividade física estruturada e realizada de forma sistemática com a meta de manter ou incrementar a saúde ou aptidão física em todas as suas vertentes”.

A literatura relata que existem características específicas que definem tipos diferentes de práticas de exercícios físicos. Dentre estas, pode-se classificar os exercícios como anaeróbicos e aeróbicos (POWERS e HOWLEY, 2000; POWERS e HOWLEY, 2009).

O exercício aeróbico caracteriza-se como uma atividade capaz de trabalhar diversos grupos musculares, de forma contínua e compassada, de modo a favorecer uma distribuição de oxigênio mais lenta pelo organismo, quando comparado aos exercícios anaeróbicos (POWERS *et al.*, 2000). Os exercícios aeróbicos assumem como

característica principal o alto consumo de oxigênio pelos tecidos, “sendo regulado pela capacidade máxima dos sistemas pulmonar e cardiovascular na captação e no transporte do oxigênio” (GOES, 2013 p. 7; REIS, 2011). Sendo assim, essa categoria de exercícios baseia-se no formato rítmico de sua execução, sendo realizados de forma contínua e geralmente com longa duração. Sua prática exige o uso de grande quantidade de grupos musculares, de forma a contribuir para a utilização de reservas de gordura (HOLLOSZY, 1982; FOX, 2006).

Contemplam alguns tipos de exercícios aeróbicos, o ato de correr, pedalar, andar e nadar, por exemplo, pois são categorias de exercícios contínuos e prolongados, exigindo do organismo grande consumo de oxigênio durante sua execução, dependendo da intensidade e da duração do esforço físico (POWERS e HOWLEY, 2009).

2.3.1 Exercício Aeróbico Intervalado e Exercício Aeróbico Contínuo

Os exercícios aeróbicos podem ser classificados de modo geral, em intervalados ou contínuos.

O treinamento tipo intervalado, é realizado de forma intermitente, sendo caracterizado por períodos alternados de exercícios, combinado com intervalos de recuperação, sem necessariamente haver uma razão fixa entre a intensidade e duração do exercício e da atividade de recuperação (DE LUCAS *et al*, 2009). Esse tipo de treinamento possibilita períodos de descanso entre os exercícios físicos realizados, permitindo se manter na realização do programa de treino por um tempo maior, se comparado a um treinamento contínuo (TODD *et al.*, 2013).

Ao contrário do treinamento intervalado, o treinamento contínuo caracteriza-se pela execução de exercícios físicos de baixa e média intensidade, por um período de tempo, havendo apenas um intervalo de recuperação, ocorrendo após seu término (ALMEIDA e PIRES, 2008; SIJIE *et al*, 2012). Esse tipo de exercício é utilizado como preparação física

para atividades que envolvem maior resistência do organismo, pois necessitam do armazenamento muscular de energia aeróbica (TODD *et al*, 2013).

Em relação aos benefícios gerados para o organismo, se comparados os treinamentos do tipo intervalado e contínuo, Wilmore e Costil (2001) descrevem que há praticamente os mesmos benefícios entre estes dois tipos de treinamento, tendo o treinamento contínuo à desvantagem de ser mais monótono para o praticante.

Ainda conforme Wilmore e Costil (2001), o método de treinamento intervalado contribui fortemente para o desenvolvimento da capacidade aeróbica, sendo “que a chave para esse tipo de treinamento está no volume de séries de trabalho-recuperação”. De acordo com Weineck (1989), o treinamento intervalado pode ser classificado quanto ao volume e intensidade como extensivos ou intensivos, bem quanto aos intervalos existentes como breves, médios ou longos, estando relacionados com o objetivo que se quer atingir. Conforme Almeida e Pires (2008), “o método extensivo caracteriza-se por um volume elevado e uma intensidade relativamente baixa, priorizando o sistema aeróbio; já no intensivo, o volume é relativamente baixo e a intensidade é elevada (excede 90% do $VO_2máx$), melhorando a capacidade anaeróbia”.

2.3.2 Exercício, Radicais Livres e o Balanço Redox

A homeostase do organismo sofre alteração no exercício físico, pois a necessidade de energia da musculatura em ação torna-se aumentada, considerando que na prática de exercício de forma vigorosa o dispêndio de oxigênio total corporal aumenta dez a vinte vezes o seu valor, bem como também sofre alteração elevando de cem a duzentas vezes a captação de oxigênio pelo tecido muscular. Essas variações quanto ao metabolismo do oxigênio facilitam e promovem a formação de RL e as adaptações fisiológicas e químicas se fazem necessárias (BRUM, 2003; MALCOLM, 2016).

De forma compensatória, ocorre à ativação dos chamados mecanismos de adaptação fisicoquímicos, entre eles está à produção de enzimas antioxidantes que tem o papel de moderar os danos promovidos pelo estresse oxidativo. Releva-se que o tipo, intensidade e duração do exercício são a base para a magnitude das respostas ao

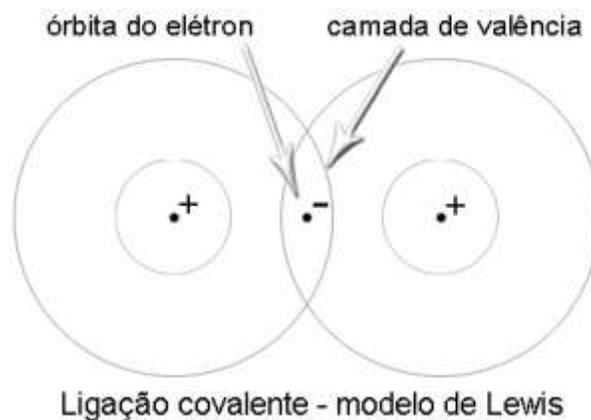
estresse oxidativo e a produção de mecanismos de defesa contra esses agentes agressores, considerando que os protocolos TC e HIIT, são considerados modelos de treinamento eficazes em promover o balanço redox celular (GIBALA *et al*, 2012; TJONNA, 2008).

2.4 Radicais Livres (RL) e Estresse Oxidativo (EO)

Os primeiros estudos sobre RL em reações metabólicas endógenas surgiram em 1954 e foram desenvolvidos por *DENHAM HARMAN*, a partir da aplicação de uma ampla experiência em química e biologia, para uma consideração de sua influência nos processos metabólicos no organismo, modificável por fatores genéticos e ambientais (HARMAN, 2003).

De acordo com a literatura, para obter estabilidade, os átomos, com exceção dos gases nobres, precisam ter a última camada eletrônica completa (Teoria do Octeto). Para completar sua valência, as ligações químicas são estabelecidas pelos átomos (RUSSEL, 1994).

Figura 1: Modelo de Lewis.



Fonte: Adaptado de ALVARÉZ, 2005.

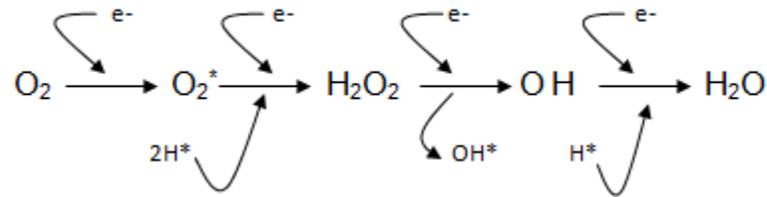
Os RL caracterizam-se por serem espécies químicas reativas instáveis, devido a falta de emparelhamento de elétrons, não tendo a camada de valência completa. Sua formação se dá por fissão homolítica onde há ruptura da ligação química em uma molécula, e decorrente da ruptura, cada átomo participante retém um elétron dos dois que estavam ligados e então forma-se radical. O elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio e nitrogênio são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), respectivamente (BARREIROS; DAVID, 2005).

A formação dos RL ocorre em processos fisiológicos e não fisiológicos respectivamente, como no metabolismo de carboidratos, na respiração celular a fim de produzir energia, na promoção e regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular, e nos processos de defesa do organismo através da fagocitose. A produção não fisiológica se dá de várias formas como por exemplo, através do consumo de álcool e cigarro, uso de medicamentos, alimentação rica em lipídeos, poluição ambiental, raios solares e exercício físico (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os RL, caracterizados por serem moléculas altamente reativas, são formados em grande parte nas mitocôndrias, durante o metabolismo aeróbio, através da ativação da cadeia de transporte de elétrons, para a formação de ATP. Durante a respiração inalamos o oxigênio e sua metabolização se dá através do uso de 85% a 90% deste pelas mitocôndrias, na cadeia de transporte de elétrons, e os outros 10% a 15% são utilizados em reações químicas diretas (NELSON e COX, 2008).

Ao finalizar a cadeia de transporte de elétrons, 95% a 98% do oxigênio transforma-se em água e os 2% a 5% reduzem-se em metabólitos que são as chamadas ERO. Cada mitocôndria pode produzir por volta de 10^{-7} RL/dia, a partir da redução do oxigênio (DORMANDY, 1983; NORDBERG *et. al.*, 2001; NELSON e COX, 2008).

Figura 2: Geração de ERO a partir da redução do oxigênio.



Fonte: Adaptado de (NORDBERG *et al*, 2001)

O motivo pelo qual respiramos o oxigênio é o seu uso final como acceptor de elétrons no metabolismo aeróbio na equação final de ATP + água, para assim converter a energia dos nutrientes alimentares em energia biologicamente utilizável para o funcionamento do organismo(POWERS e HOWLEY, 2009)

Segundo Powers e Howley (2009), o que determinará a quantidade de RL que serão produzidos durante o exercício é a velocidade do metabolismo aeróbico, uma vez que as taxas de RL aumentarão se o exercício for de alta intensidade ou prolongado, e esse processo poderá causar dano, como a fadiga muscular.

2.4.1 Principais EROS

2.4.1.1 Radical Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$)

O $\text{O}_2^{\bullet -}$ é formado na cadeia de transporte de elétrons, na ação fagocitária, onde a enzima NADPH oxidase é ativada na defesa do organismo por meio dos neutrófilos, monócitos e macrófagos, além de ser formado nas reações de autooxidação e enzimáticas. Esse radical inicia e propaga as cadeias radicalares de componentes que se auto-oxidam como a hemoglobina, mioglobina e catoccolaminas (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

2.4.1.2 Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

É formado na matriz mitocondrial no processo de redução do oxigênio ou através da dismutação do O₂⁻ pela enzima superóxido dismutase (SOD). É gerador do radical hidroxila (OH⁻), na presença de metais de transição, como o ferro e o cobre (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

2.4.1.3 Radical OH⁻

Esse radical é altamente reativo devido a sua meia vida curta de 7x10⁻⁴ segundos e 10⁻¹⁴ vezes mais reativo do que o íon hidroxila. O organismo não tem enzimas para sua remoção, e uma vez gerado poderá causar danos em proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA (SALVADOR; HENRIQUES, 2004) .

O OH⁻ poderá ser formado através da reação de Haber- Weiss, onde ocorre a reação do radical O₂⁻ com o H₂O₂.

Figura 3: Reação de Haber- Weiss



Fonte: SALVADOR; HENRIQUES(2004).

O OH⁻ também poderá ser formado através da reação de Fenton. Em nosso organismo, dentre os metais de transição, o ferro está mais biodisponível, pois ele encontra-se complexado com proteínas de transporte, como a transferrina, e também em proteínas de armazenamento, como a ferritina e hemossiderina. Na presença de íons metais de transição, como o ferro, o H₂O₂ leva a formação do OH⁻ (BARREIROS *et al.*, 2006).

Figura 4: Reação de Fenton

Fonte: SALVADOR; HENRIQUES(2004).

2.4.1.4 Oxigênio *Singlet* (O_2^1)

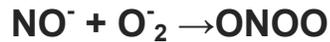
Considerado altamente reativo, tem uma meia-vida de menos de 0,5 microssegundos. Pode ser produzido pela reação dos fagócitos, por reações catalisadas e por peroxidases. O O_2^1 pode dar início à peroxidação lipídica, gerando radicais alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e peróxila ($\text{ROO}\cdot$), e seu dano também pode ser ao DNA (SALVADOR; HENRIQUES, 2004; SILVA *et al.*, 2010).

2.4.2 Principais ERN

2.4.2.1 Óxido Nítrico (NO)

Durante o processo de oxidação do óxido nítrico se forma o cátion nitrozônio (NO^+) e na redução do elétron surge o ânion nitroxila (NO^-) e este pode gerar o óxido nitroso (N_2O) e o OH^- ; e ainda na reação com O_2^- se forma o peroxinitrito (ONOO^-). O NO é formado pelo conjunto de proteínas óxido nítrico sintases (NOS), onde o aminoácido L-arginina é transformado em radical NO e em L-citrulina. A NOS é encontrada principalmente nos sistemas neuronal e endotelial (SALVADOR; HENRIQUES, 2004; SILVA *et al.*, 2010; POWERS e HOWLEY, 2009).

A importância biológica do NO está na ação que ele promove no endotélio vascular no processo de relaxamento do vaso sanguíneo, auxiliando na vaso proteção e manutenção do tônus muscular, regulação da pressão sanguínea, prevenção da agregação plaquetária e a inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular, assim como na sua associação com o sistema imune destruindo patógenos e células tumorais sendo o NO o principal mediador desse sistema de defesa do organismo.

Figura 5: Formação do peroxinitrito (ONOO)

Fonte: SALVADOR; HENRIQUES(2004).

Diferentemente dos níveis fisiológicos, o NO pode ser potencialmente tóxico, por exemplo quando sua concentração encontra-se diminuída em doenças arteriais coronarianas e na condição de inflamação vascular, onde a reação inflamatória/proliferativa na parede vascular eleva a secreção de citocinas pró-inflamatórias que em excesso danificam o endotélio, prejudicando a sua vasodilatação, levando a apoptose destas células e a injúria endotelial. Dados da literatura mostram que essas citocinas são secretadas em quantidade superior aos níveis orgânico-funcionais em obesos, causando injúria a todo o sistema (KUMAR et al., 2013).

2.4.1.2 Espécies radicalares e não- radicalares

As espécies reativas de nitrogênio incluem o NO· óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-)¹⁰. Sua ação deletéria no organismo inclui dano a lipídeos, proteínas e DNA (BARREIROS *et al*, 2006), (Tabela 2).

Tabela 2: Espécies reativas do nitrogênio

RADICAIS	NÃO-RADICAIS
Óxido Nítrico (NO)	Ácido nitroso (HNO ₂)
Dióxido de nitrogênio (NO ₂ ·)	Trióxido de dinitrogênio (N ₂ O ₃)
	Tetróxido de dinitrogênio (N ₂ O ₄)
	Íon Nitrila (NO ₂ ⁻)
	Cátion nitrosônio (NO ⁺)
	Ânion nitroxila (-NO)
	Peroxinitrito (-ONOO)
	Alquil peroxinitrito (ROONO)
	Nitril clorido (NO ₂ Cl)

Fonte: (adaptado de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000)

2.5 Estresse Oxidativo

Os RL promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas. Por exemplo, quando uma enzima tem seus aminoácidos alterados, pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente. Por outro lado, o nosso organismo precisa de RL para combater infecções bacterianas, para a produção de NO, com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de algumas doenças como a HA, e também para agir em processos de detoxificação hepática de medicamentos. Em contrapartida, o excesso de RL, em comparação com o sistema protetor intrínseco de cada célula, desencadeia o estresse oxidativo e como consequência afeta a saúde humana por ser gerador de diversas doenças (MAYER, 2000).

Os danos mais graves mediados pelos RL são os causados ao DNA e RNA. Estudos mostram que quando a cadeia do DNA é quebrada, ela pode assumir outra posição e sua nova locação pode alterar suas bases anteriormente ordenadas, ocasionando mutação. De acordo com a literatura, a partir de bases danificadas poderá ocorrer o processo de oncogênese (BARREIROS *et al.*, 2006).

De acordo com Russel (1994), os RL como o $O_2^{\bullet-}$, o radical OH^{\bullet} e o H_2O_2 , podem promover a peroxidação lipídica dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, com produção de hidroxiperóxidos lipídicos, aldeídos e isoprostanos. O Malondialdeído (MDA) é um desses produtos secundários da peroxidação lipídica que, por ser um produto estável, pode ser utilizado como medida cumulativa desse processo (RUSSEL, 1994; POWERS e HOWLEY, 2009).

Quando a membrana celular é lesionada através da oxidação de lipídeos, o papel de permeabilidade da mesma pode ser afetado, interferindo no transporte ativo e passivo transmembrana, podendo causar ruptura e consequente morte celular. Nas células sanguíneas, a peroxidação lipídica agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo de lipídeos e ocasionando consequentemente, a aterosclerose (BARREIROS *et al*, 2005).

Esse desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes (RL) e os mecanismos antioxidantes de defesa do organismo, que levam ao estresse oxidativo, está envolvido na etiopatogênese de diversas doenças, incluindo a obesidade (MAYER, 2000; POWERS e HOWLEY, 2009; FERREIRA *et al*, 2007).

Os ataques ao organismo pelos RL em excesso são combatidos em parte por proteção enzimática e não enzimática, por micromoléculas, que podem ter origem endógena ou serem adquiridas através de dieta ou suplementação. Estas micromoléculas atuam de forma direta contra os RL ou na reparação dos danos que o organismo sofreu por essas espécies (POWERS e HOWLEY, 2009).

As enzimas antioxidantes, que constituem a proteção enzimática, possuem papel importante na remoção de xenobióticos, que são substâncias tóxicas capazes de causar lesão e morte celular, e na remoção de RL. As principais enzimas envolvidas no processo são a catalase (CAT), superóxido-dismutase (SOD) e glutathiona-peroxidase (GSH-Px). Quando a lesão já ocorreu, entram em ação as enzimas que reparam o dano celular por intermédio das enzimas glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px. Estes agentes antioxidantes estão presentes no meio intracelular (FERREIRA *et al*, 2007).

2.5.1 Enzimas antioxidantes

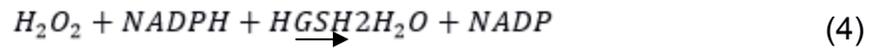
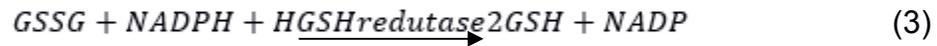
A enzima SOD, catalisa a eliminação do radical $O_2^{\bullet-}$, transformando-o em oxigênio e H_2O_2 . Essa transformação do radical $O_2^{\bullet-}$ também ocorre naturalmente, entretanto, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$. É uma reação de segunda ordem, portanto há necessidade de maior concentração de radical $O_2^{\bullet-}$ para ocorrer. Quando a enzima SOD está presente, ocorre mais facilmente a dismutação, tornando a reação de primeira ordem, excluindo a colisão entre as moléculas. A ação desta enzima permite a remoção do $O_2^{\bullet-}$ mesmo em baixas concentrações (CLARKSON *et al*, 2000).

No organismo existem duas formas de SOD, a citosólica, contendo Cu^{2+} e Zn^{2+} no sítio ativo e a mitocondrial, que possui Mn^{2+} como centro redox (WICKENS, 2001).

Corroborando com a atividade da SOD, a enzima catalase age na remoção do H_2O_2 , transformando-o em oxigênio e água, conforme mostrado na expressão 1 (FERREIRA *et al.*, 2007; BARREIROS *et al.*, 2006; HARMAN, 2003), mostrada a seguir:



O co-fator glutationa (GSH), em conjunto com as enzimas GSH-Px e glutationa redutase (GR), atua no sistema antioxidante do organismo. Essa ação catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, onde a GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença da GSH-Px, formando uma ponte dissulfeto (GSSG). Após a GSH é regenerada, sob ação da enzima GR, conforme expressões 2 a 4 (FERREIRA *et al.*, 2007; BARREIROS *et al.*, 2006; HARMAN, 2003), mostradas a seguir:



Além das defesas antioxidantes citadas, várias micromoléculas atuam a fim de exercer um efeito metabólico ou fisiológico no combate ao estresse oxidativo, sendo os mais importantes o α - tocoferol e o ácido ascórbico, além dos carotenóides, da bilirrubina, da ubiquinona e do ácido úrico (FERREIRA *et al.*, 2007; BARREIROS *et al.*, 2006; HARMAN, 2003).

2.5.2 Antioxidantes Exógenos Não-Enzimáticos

2.5.2.1 Vitamina E

A vitamina E compreende um grupo de oito substâncias que se assemelham por desempenhar ação antioxidante e são denominadas tocoferóis, sendo o α - tocoferol o mais importante. Possui função antioxidante, uma vez que diminui a formação do $O_2^{\cdot 1}$ *in vivo*, e ajuda na remoção de RL já formados. Tem papel fundamental de detoxificação dos LOO* formados durante o processo de peroxidação lipídica, sendo nessa reação transformado em radical tocoferil. O alfa-tocoferol pode ser encontrado em verduras como espinafre, couve e alface, agrião, óleos vegetais como de algodão, milho, soja, azeite de dendê, bem como em ovos, cereais e oleaginosas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; GUARATINI *et al*, 2007)

2.5.2.2 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico tem a característica de ser hidrossolúvel, é essencial na reparação de tecidos, desempenhando papel significativo no metabolismo de

carboidratos, na síntese de lipídeos e proteínas e também age na respiração celular. Sua principal função é de proteção e resistência contra infecções, auxiliando o sistema imunológico, em virtude da sua propriedade antioxidante, neutralizando os radicais livres nas células. O ácido ascórbico tem a função de detoxificar o radical tocoferil formado na peroxidação lipídica, transformando-o novamente em alfa-tocoferol (CRUZAT *et al*, 2007; VILLANUEVA *et al*, 2012).

As principais fontes dessa vitamina são as frutas cítricas como a acerola, maracujá e kiwi e legumes e verduras como brócolis, pimentão vermelho, repolho e couve-flor (CERQUEIRA *et al*, 2007; DE ANGELIS, 2004).

2.5.2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são estruturas químicas presentes em microorganismos e alimentos de origem vegetal e são classificados como fenóis simples ou polifenóis, baseado no número de unidades de fenol na molécula, destes destacam-se, os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, lignanas e tocoferóis (ANGELO, 2007).

Sua definição química os classifica como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos. Seus grupos funcionais apresentam estruturas multifuncionais variadas que nos alimentos conferem a cor, aroma, adstringência e propriedades antioxidativas. As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos estão na sua habilidade em doar elétrons, bem como devido sua capacidade quelante, desta forma interrompendo as reações em cadeia e o estresse oxidativo (SILVA *et al*, 2010).

2.5.2.4 Carotenoides

São encontrados na natureza aproximadamente 600 carotenoides, possuem ação antioxidante, atuam como debeladores do O_2^1 , e inibem a peroxidação lipídica. A eficiência como antioxidante varia entre os diferentes carotenoides, sendo o licopeno

(C₄₀H₅₆), que também é encontrado no plasma e em tecidos humanos, considerado o mais eficiente como capturador de O₂¹ e radicais peroxil. Estudos sugerem que o processamento térmico de elevação de temperatura do licopeno torna o mesmo mais biodisponível e, portanto, mais eficaz (BARTOSZ, 2013).

2.5.2.5 Taurina

É um betaminoácido 2 aminoetanossulfônico não essencial que está incorporado nas proteínas do nosso organismo, sendo um dos mais abundantes compostos no corpo humano. Sua síntese natural ocorre principalmente no fígado e cérebro, onde atua como neurotransmissor. Também atua melhorando a sinalização dos hormônios leptina e insulina, ambos com papel de reguladores da ingestão alimentar e na transformação da glicose em energia (CAMARGO, 2015; CARVALHO, 2006).

Ela está também ligada ao fator de crescimento celular, apoptose e síntese de proteína mitocondrial, proporcionando aumento da atividade da cadeia de transporte de elétrons e protegendo a mitocôndria contra a geração excessiva de RL, e agindo na desintoxicação de ácido hipocloroso. Pode ser encontrada nas carnes e peixes (JONG *et al*, 2010; SCHAFFER *et al*, 2009).

2.5.2.6 Flavonóides

Definidos como compostos bioativos são classificados como compostos fenólicos que diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares. Ocorrem como agliconas e glicosídeos e são subdivididos em cinco principais grupos que compreendem as antocianinas, flavonas, flavononas, flavonois e isoflavonoides. O termo flavonoide é um nome que define os pigmentos de plantas derivados benzo-g-pirona¹⁹, sua forma é estruturada como difenil propano (C₆C₃C₆), com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (BEHLING, 2008).

As características terapêuticas dos flavonoides concentram-se especialmente na quercetina, devido seu potencial antioxidante. Atua conferindo proteção contra os RL, e como queladora dos íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais hidroxila através da Reação de *Fenton* ou *Harber-Weis* e protegendo a célula contra a peroxidação lipídica. Também considerada terapeuticamente anticarcinogênica e com efeitos protetores aos sistemas hepático, renal e cardiovascular (DUZZIONI, 2009).

Alguns alimentos ricos em flavonoides são os frutos secos, a soja, os chás, especialmente o chá verde, vinho tinto, frutas cítricas como açaí, laranja, tangerina, uva, bulbos como a cebola, tomates e chocolate amargo (BEHLING, 2008; DUZZIONI, 2009).

2.5.2.7 Ubiquinona-Coenzima Q10 (CoQ10)

A Ubiquinona ou CoQ 10 é uma molécula que existe e atua em todas as células do organismo humano, principalmente nas células que necessitam de um fornecimento superior de energia, como é o caso das células musculares, como as cardíacas e músculo esqueléticas. A CoQ 10 desempenha papel fundamental no metabolismo energético, atuando como um cofator da produção de energia mitocondrial e na proteção antioxidante celular, diminuindo o dano potencial dos RL resultantes da peroxidação lipídica. Pelos meios dietéticos ela pode ser encontrada na carne bovina, sardinha, espinafre e no amendoim (DEICHMANN, 2010).

3 INTERDISCIPLINARIDADE

O estilo de vida da sociedade atual, associado á maus hábitos alimentares e a falta de atividade física, tem levado ao aumento dos índices de obesidade que é considerada um grave e crescente problema de saúde pública, devido ás implicações nos efeitos negativos sobre a morbidade e mortalidade de pessoas de ambos os sexos e de diversas faixas etárias.

A obesidade se torna um sério problema devido ao fato de a doença além de ser causada pela sua associação com diversas comorbidades, na mesma proporção ela se torna fator de risco para várias doenças como as cardiovasculares, metabólicas e neoplásicas.

A presença crônica da obesidade na vida dos indivíduos aumenta a carga e desafios individuais e sociais que recaem sobre todos nós, mesmo que não a soframos diretamente suas consequências. Essa condição gera custos financeiros com um ônus alto, não somente pela necessidade de acompanhamento de saúde, mas também pelas consequências psicológicas – emocionais que acometem na diminuição da qualidade de vida particular e laboral.

Na condição da doença obesidade, a preocupação primária está relacionada especialmente com a saúde humana, entretanto a saúde ambiental também é afetada, pois os novos padrões de dieta e consumo mundial tem estimulado o crescimento populacional, demandando cada vez mais produção de alimentos que estão sendo consumidos em excesso, todo esse processo necessita de espaço e logo de mais área desmatada, mais água e investindo na contramão da sustentabilidade.

Faz-se urgente a incorporação de mudanças de conceitos referentes ao consumo sustentável e de um estilo de vida mais saudável aliando dieta e exercício físico de qualidade, e buscando soluções através de pesquisas a fim de estabelecer formas de abordagem, tanto para que as pessoas obesas possam ser tratadas, como para que a

prevalência da obesidade que afeta grande parte da população possa ser repensada para o futuro sustentável do meio ambiente e dos indivíduos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e Tratamento

A pesquisa realizada envolveu animais de modo que os cuidados tomados seguiram as diretrizes governamentais, conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Univille, sob o ofício número 007/2014 PRPPG/CEP.

4.2 Amostra

O tipo de estudo foi quantitativo experimental a partir de amostras de ratos machos Wistar total amostral (n= 24), com dez semanas de idade (250 ± 50 g de massa corporal), provenientes do Biotério da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Os animais foram alocados em caixas com lotação máxima de quatro ratos, com ração (consumo em 24h medido uma vez por semana) e água ad libitum, ciclo claro-escuro invertido de 12 horas e temperatura e umidade relativa do ar controladas (21 ± 2 °C e 60%, respectivamente).

4.3 Desenho Experimental

4.3.1 Indução de Obesidade

Durante oito semanas, vinte e quatro ratos foram divididos em dois grupos de animais – dieta normolipídica (DNL) e dieta hiperlipídica (DHL). Os animais do grupo DNL foram alimentados com ração-padrão (Nuvital Nutrientes S/A. Curitiba-PR; com composição de 70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% lipídeos) e água ad libitum.

Os animais do grupo DHL foram alimentados com ração hiperlipídica (Prag Soluções Biosciências, Jaú, São Paulo-SP; com composição de 20% de carboidratos, 20% de proteínas e 60% de lipídios) e água *ad libitum*.

4.3.2 Formação dos Grupos Experimentais

Após as oito semanas da administração das dietas normolipídicas e hiperlipídicas, os animais foram divididos, aleatoriamente, nos seguintes grupos (n=6 cada grupo): dieta normolipídica sedentários (DNL-SED); dieta hiperlipídica + treinamento aeróbio contínuo (DHL-TC); dieta hiperlipídica + treinamento aeróbio intervalado de alta intensidade (DHL-HIIT) e; dieta hiperlipídica sedentários (DHL-SED).

4.4 Protocolos de Treinamento Aeróbico

Os protocolos de treinamento foram realizados durante oito semanas, tendo uma semana de adaptação, totalizando nove semanas; os dois protocolos, 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 máximo. O treinamento aeróbico intervalado de alta intensidade (HIIT) consistia em três minutos à intensidade de 60% seguidos de quatro minutos à 85% da velocidade máxima do teste. Este ciclo era repetido sete vezes, totalizando 49 minutos de treinamento. No treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada (TC), a intensidade do exercício mantinha-se em 60% da velocidade máxima de teste e a duração do treinamento era a necessária para igualar a distância percorrida no treinamento HIIT (protocolos isocalóricos), totalizando aproximadamente 60 minutos. Ambos os protocolos eram precedidos de cinco minutos de aquecimento a 40% de intensidade.

4.4.1 Teste de tolerância ao esforço máximo

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.

4.5 Protocolo Experimental – Amostras

Após o término da oitava semana de treinamento aeróbico, totalizando 17 semanas de experimento, ocorreu o sacrifício dos animais (48h após a última sessão de treino). Considerando que foram avaliadas técnicas de estresse oxidativo, os animais foram sacrificados por decapitação na ausência de anestesia e em seguida, o fígado e os músculos foram removidos e o sangue coletado para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo. Os experimentos foram realizados conforme as normas da legislação e ética para a prática didático-científica da vivisseção 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).

4.6 Preparação dos Eritrócitos e do Plasma:

Os eritrócitos e o plasma foram preparados a partir de amostras de sangue total obtidas de ratos. O sangue total foi centrifugado a 1,000 x g, o plasma foi separado e congelado para posterior determinação. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L cloreto de sódio). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, eritrócitos foram congelados e descongelados 3 vezes e centrifugados a 13,500 × g por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína.

4.7 Preparação do Tecido

O fígado, rim e estruturas cerebrais foram removidas, decapsuladas e mantidas em gelo com tampão salina (154 mM NaCl, 5 mM Tris-HEPES, pH 7.5). O homogeneizado (15%) (p/v) foi preparado em tampão adequado, conforme metodologia a ser empregada, usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a × 3.000 g, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes, TBA-RS, proteínas carboniladas e conteúdo total de sulfidrilas.

4.7.1 TBA-RS

TBA-RS é usado como um índice de dano a lipídeos e mede o MDA, um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por RL OH•. 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 malondealdeído por mg de proteína.

4.7.2 Proteínas Carboniladas

A carbonilação das proteínas foi determinada de acordo com o método descrito por Reznick e Packer (1993), o qual se baseia na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, que foi medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200 μ L de homogeneizado foi adicionado a tubo de ensaio contendo 400 μ L de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M). Foi mantido no escuro durante 1 h e agitado em vórtex a cada 15 min. Depois disso, 500 μ 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 ressuspense em 600 μ L de guanidina 6M (preparado em solução de fosfato de potássio 20 mM pH 2,3).

A amostra foi submetida à vórtex e incubada a 60°C durante 15 min. Depois disso, foi centrifugada a 14000 rpm durante 3 min e o sobrenadante foi usado para medida da absorbância a 370 nm. Os resultados foram relatados como conteúdo de carbonila (nmol / mg de proteína).

4.7.3 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 foi mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50 μ L de homogeneizado foram adicionados a 1 ml de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A

reação foi iniciada pela adição de 30µl de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

4.7.4 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Aebi (1984). A decomposição do H₂O₂ foi monitorada em espectrofotômetro a 240 nm por 90 segundos. Uma unidade de enzima é definida como 1 µmol de H₂O₂ consumido por minuto e a atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

4.7.5 Glutathione 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. Uma unidade de enzima foi definida como 1 µmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

4.7.6 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985). A auto-oxidação do pirogalol foi continuamente monitorada com espectrofotômetro em 420nm. A atividade específica foi expressa em unidade por mg de proteína.

4.7.7 Dosagem de Proteínas

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

4.8 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.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ARTIGO 1: EFFECTS OF TWO AEROBIC EXERCISE TRAINING PROTOCOLS ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN BLOOD AND LIVER OF OBESE RATS

EFFECTS OF TWO AEROBIC EXERCISE TRAINING PROTOCOLS ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN BLOOD AND LIVER OF OBESE RATS

Ariene Sampaio Souza Farias Ulbricht², Daniela Delwing de Lima^{1,2}, Carla Werlang-Coelho^{3,4}, Debora Delwing Dal Magro⁵, Victor Hugo Antonio Joaquim^{2,3}, Eloise Mariani Salamaia¹, Silvana Rodrigues de Quevedo⁶, Larissa Desordi⁶

¹ Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, R Paulo Malschitzki, 10, Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

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

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

⁵ 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.

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

* Address for correspondence: Dra. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br

ABSTRACT

We evaluated the effects of two aerobic exercise training protocols (AETP), the moderate-intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT), on the alterations caused by high-fat diet (HFD) on oxidative stress parameters in the blood and liver of rats. First of all, animals received 8 weeks of HFD or normal-diet (ND); then, plus more 9 weeks of HFD or ND and two AETP. Results showed that HFD enhanced TBA-RS, protein carbonyl content, reduced total sulfhydryl content, diminished the activity of CAT and GSH-Px and did not alter SOD activity in the blood of rats, while the protocols of MICT and HIIT prevented the increase in TBA-RS levels, partially the increase in protein carbonyl content, the reduction of CAT activity, but did not prevent the reduction in total sulfhydryl content and GSH-Px activity. The HIIT protocol also enhanced the activity of SOD. Subsequently, results showed that HFD did not alter TBA-RS, total sulfhydryl content and SOD activity in the liver of rats. Furthermore, HFD increased protein carbonyl content and CAT; and, diminished GSH-Px activities; both exercise protocols could prevent the increased in protein carbonyl content and the MICT protocol prevented the alteration in CAT activity, while the HIIT protocol could not prevent this increased; furthermore, both protocols weren't able to prevent the decreased in GSH-Px activity. In conclusion, our study showed that HFD elicits oxidative stress in the blood and liver of rats and that both protocols of AETP (MICT and HIIT) were able to prevent most of the alterations caused by HFD in the oxidative stress parameters tested.

Keywords: Aerobic exercise training protocols, oxidative stress, blood, liver.

INTRODUCTION

Obesity is considered a polygenic and multifactorial disease, due to genetic susceptibility and interactions with dietary, environmental and metabolic variables (Eiholzer et al, 2002). It is characterized by excessive body fat, resulting from the deposit of triacylglycerol and free fatty acids, which consequently lead to weight gain and increased body mass index (BMI) (Kumar et al, 2013).

The increase in obesity is closely related to the type of ingested diet, and today there is a growing demand and supply for a feed known as Cafeteria Diet, westernized or fast food, which is made up of processed foods rich in fat and carbohydrates, which makes it highly palatable and caloric, promoting voluntary hyperphagia, able to influence the weight gain, cause dysfunction in organs and systems, and lead to diseases associated with obesity (Jacobs et al, 2013; Menezes, 2010; Louzada, 2016; Lyra, 2012).

With increasing BMI, the respiratory, metabolic and vascular systems suffering stress, due to work load greater than usual, and induces a decrease in physiological reserve with significant/negative changes in the homeostasis of organism (Coutinho, 2006). Studies have shown that the prevalence of obesity associated with other comorbidities is rapidly increasing, and it is closely related to the adoption of a sedentary lifestyle (Gómez-Cabello, 2012; OMS, 2015).

Data shows that obesity is associated with decreased quality of life and the risk of premature death, being computed as the main cause of preventable death, together to tabaco (Viuniski, 2003).

Another important aspect is that obesity is associated with a chronic inflammatory state, characterized by abnormalities in the production of proinflammatory cytokines, such as leptin, whose function is to encode genes involved in the regulation of body weight (Brewis, 2011; Kumar et al, 2013). The literature shows that in obese individuals is a low sensitivity or an inadequate response to the action of leptin. Both leptin and angiotensin 2, which have expression and production in adipocytes, are related to endothelial dysfunction, since it decreases the availability of nitric oxide and act as generators of free radicals of oxygen, causing damage to the vascular tissue (Mayer, 2000).

According to Melo (2014), the presence of chronic inflammation predisposes to many conditions, like diabetes mellitus, dyslipidemia and hypertension, and reduces immune capacity and increases metabolic and cardiovascular risks. In addition, the disease may also have psychological, emotional and social impact, being associated with mental disorders, such as depression and anxiety

(Bolner, 2006; Sassi, 2010). With respect to type 2 diabetes, this occurs due to fatty tissue deposit in visceral region, which causes an increased production of glucose, and hyperinsulinemia, that contributes to increased sodium retention, resulting in hypertension and other cardiovascular diseases (Fox, 2006; Bolner, 2006; Sassi, 2010).

Associated with this condition, the production of free radicals can cause peroxidation of the polyunsaturated fatty acids present in the cell membranes, with consequent production of lipid hydroxiperoxides, aldehydes and isoprostanes (Barreiros et al, 2006; Powers and Howley, 2009; Russel, 1994). Studies have shown that the imbalance between pro-oxidants and antioxidants defense mechanisms lead to oxidative stress, involved in the etiopathogenesis of various diseases, including obesity (Mayer, 2000; Powers and Howley, 2009; Ferreira and Matsubara, 1997).

Multiple therapies have been suggested and used to reduce the harmful results of obesity and its comorbidities, among them are the conduits used to minimize these deleterious effects on the cellular level, and therefore systemic, such as physical exercise, which is appropriate in most cases as non-drug therapy, to prevent and treat obesity and their physical and metabolic cellular complications (Harman, 2003; Sassi, 2010; Amorim and Faria, 2012).

The first study to find a correlation between physical exercise and increase in the antioxidant enzymes was in 1983, in both cardiac and skeletal muscles (Quintanilha and Packer, 1983). Since then numerous studies had shown that other tissues responses to exercise by improving the antioxidant defense system and by increasing its resistance against the free radicals actions (Somani et al, 1995; Polidori et al. 2000; Sugama et al, 2015). The majority of studies about this theme use the endurance training to observe these alterations (Radak et al, 2001; Oztasan et al, 2004; Chalimonkiuk et al, 2015), but recently the high-intensity interval training (HIIT) is being studied because of its positive effects in many variables and for being considered a time-efficient strategy (Gibala et al, 2006a; Burgomaster et al, 2008) which is an option to quit the sedentary lifestyle when there is few time to spend on exercises.

Considering the high global rates of obesity, associated with a sedentary lifestyle, this study aimed to evaluate the effects of two aerobic exercise training protocols (AETP), the moderate-intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT), on the alterations caused by high-fat diet (HFD) on oxidative stress parameters in the blood and the liver of 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, were randomly assigned into HFD (protein, 20%; carbohydrate, 20%; and, lipid, 60% - Prag Soluções Biosciências, Jaú-SP) or normal diet (ND) (protein, 20 kcal%; carbohydrate, 70 kcal%; and, lipid, 10 kcal%; - Nuvital Nutrientes, Curitiba-PR) during 8 weeks. The rats were maintained in a light-dark inverted cycle (12:12-h light-dark cycle), temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), controlled environment 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 trained with different AETP as follow: HFD-MICT, n=6 and HFD-HIIT, n=6. Animals from the ND were assigned to one untrained group (ND-UNT; n=6). After this phase, these 4 experimental groups had more 9 weeks of diet and training. AETP are described in detail below. All rats were euthanized three days post last day training. 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 Regiao de Joinville, Joinville, Brazil) Ethics Committee (Protocol No. 002/213 – COEA). All chemicals used in the analysis of oxidative stress parameters were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Aerobic Exercise Training Protocols (AETP): (1) Moderate-Intensity Continuous Training (MICT) and (2) High-Intensity Interval Training (HIIT)

Before the AETP, rats were conditioned to treadmill exercises over a period of a week (10 minutes of exercise per session), and in the end of this period, they were submitted a graded treadmill exercise test.

Graded Treadmill Exercise Test: During the test, rats were placed on the treadmill and allowed to acclimatize for at least 10 minutes. Rats ran on a graded treadmill until exhaustion at 20° 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 4th and 8th week of exercise training.

Both AETP consisted of an 8 week program running on a motorized treadmill (KT-4000 model INBRAMED, RS, Brazil), at 20° inclination, 5 days a week.

(1) MICT: was performed at a treadmill speed corresponding to 60% of the maximum running speed obtained in the graded treadmill test, which was kept unchanged throughout the entire session. (2) HIIT was performed in such a way that rats run 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. MICT and HIIT protocols were of matched volume, meaning that total running distances in each session of either MICT or HIIT were identical; therefore, MICT session duration was adjusted to match HIIT distance (Haram et al, 2008). A 5-min warm up at 40% of the maximum running speed was performed by both trained groups before each AETP 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.

Erythrocyte and Plasma Preparation

Erythrocytes and plasma were prepared from whole blood samples obtained from rats. Whole blood was collected and transferred to heparinized tubes for erythrocyte separation. Blood samples were centrifuged at $1,000 \times g$, plasma was then removed by aspiration and frozen at -80°C until use in assays. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). Lysates were prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100 μL of washed erythrocytes and frozen at -80°C until determination of the antioxidant enzyme activities.

For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thaw three times, and centrifuged at $13,500 \times g$ for 10 min. The supernatant was diluted in order to achieve an approximate concentration of 0.5 mg/mL of protein.

Tissue preparation

After decapitation, the liver was removed and kept in ice-cold buffered sodium phosphate (20mM, pH 7.4, 140mM KCl). The liver 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 5 pulses and centrifuging at $800 \times g$ 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 assaying the activity of antioxidant enzymes, damage to proteins and estimation of lipid peroxidation (Ferreira et al. 1997).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS was determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979). TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, caused mainly by hydroxyl free radicals. Liver and plasma in 1.15% KCl were mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by 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 content was calculated as nanomoles of MDA formed per milligram of protein.

Total Sulphydryl Content

The total thiol group concentration was determined by the method of Aksenov and Markesbery (2001). Briefly, 50 μL of homogenate was 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 μL of 10mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and incubated for 30 min at room temperature in a dark room. Total sulphydryl 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 μL of homogenate were added to plastic tubes containing 400 μL of 10mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2M HCl). Samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. Subsequently, 500 μL of 20% trichloroacetic acid were added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 $\times g$ 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 $\times g$ for 3 min. The supernatant

was discarded and the pellet re-suspended in 600 μ 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 were 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 H₂O₂ at 240 nm in a reaction medium containing 20mM H₂O₂, 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 μ mol of H₂O₂ 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 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 1 μ mol 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 (O₂^{•-}) which is a substrate for SOD (Marklund, 1985). Briefly, to 15 μ l of each sample, 215 μ l of a mixture containing 50 μ M Tris buffer, pH 8.2, 1 μ M EDTA and 30 μ M CAT were added. Subsequently, 20 μ l 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 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.

Protein determination

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

Statistical analysis

The data are presented as means and standard error of the means (mean \pm SEM). One-way ANOVA with post hoc testing by Duncan was used to compare the effects of training in all analyses. Statistical significance was considered achieved when the p-value was <0.05 . We used the statistical program SPSS.

RESULTS

First, we investigated the effect of two AETP, MICT and HIIT on the TBA-RS (important parameter of lipid peroxidation), total sulfhydryl content and total carbonyl content (important parameters of protein damage) and on the activity of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the blood/plasma of rats submitted to HFD.

Figure 1 shows that HFD significantly enhanced TBA-RS (A) and protein carbonyl content (C) in the HFD-UNT group when compared to the ND-UNT group ($p<0.05$), while the protocols of MICT and HIIT prevented the increase in TBA-RS levels and partially the increase in protein carbonyl content in the HFD- MICT and HFD-HIIT groups, respectively. Furthermore, Figure 1 (B) shows that HFD reduced significantly total sulfhydryl content in the HFD-UNT group when compared to ND-UNT group ($p<0.05$). In this parameter, the different protocols of training (MICT and HIIT) weren't able to prevent the alteration.

As can be seen in Figure 2, HFD significantly diminished the activity of CAT (B) ($p<0.05$) and GSH-Px (C) ($p<0.05$) in the HFD-UNT group, when compared to the ND-UNT group, but did not alter SOD (A) activity. In relation to the activity of SOD, the protocol of HIIT enhanced significantly the activity of this enzyme in the group HFD-HIIT, when compared to the HFD-UNT and ND-UNT groups ($p<0.05$). The protocols were able to prevent the reduction of CAT activity observed in the HFD-UNT group ($p<0.05$) and the protocol HIIT increased significantly the activity

of this enzyme (HD-HIIT group) when compared to the ND-UNT group ($p < 0.05$); however, the different AETP didn't prevent the reduction in GSH-Px activity observed in the HFD-UNT rats.

Subsequently, we investigated the effect of the two AETP, MICT and HIIT, on the same parameters of oxidative stress and antioxidant enzymes activity in the liver of rats submitted to HFD.

Figure 3 shows that HFD did not alter TBA-RS (A) and total sulfhydryl content (B) in the HFD-UNT group, when compared to the ND-UNT group in the liver of rats. However protein carbonyl content was significantly increased in the HFD-UNT group, when compared to the ND-UNT group ($p < 0.05$). Furthermore, the protocols of MICT and HIIT were able to prevent the increased in protein carbonyl content in the liver rats ($p < 0.05$).

With regard to SOD activity, Figure 4 (A) shows that HFD did not alter this enzyme activity in the HFD-UNT group, when compared to the ND-UNT group. The AETP also did not alter the enzyme activity, when compared the groups HFD- MICT and HFD-HIIT to the groups HFD-UNT and ND-UNT. In relation to CAT activity, Figure 4 (B), HFD increased significantly this enzyme activity in the HFD-UNT group when compared to the ND-UNT group ($p < 0.05$). The protocol MICT prevented this alteration (HFD-MICT group) when compared to HFD-UNT group ($p < 0.05$) and the protocol HIIT (HFD-HIIT group) didn't prevent this alteration. Considering GSH-Px activity, Figure 4 (C), shows that HFD significantly diminished the activity of the enzyme in the HFD-UNT group, when compared to the ND-UNT group ($p < 0.05$). Furthermore, the different protocols of training (MICT and HIT) weren't able to prevent this alteration.

DISCUSSION

The oxidative stress is considered an imbalance between pro-oxidants and antioxidants factors, having as consequence cellular injury. This process contributes significantly to the pathophysiology of several diseases, due to increased production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which are associated with inflammatory process in obesity and its comorbidities, among them, hypertension, dyslipidemias, diabetes, cardiovascular disease, sleep apnea, osteoarthritis and some cancers (Tomao et al, 2015).

The link between obesity, inflammation and oxidative stress occurs by various physicochemical mechanisms, such as elevated circulating glucose levels and increase in the production and storage of lipids, stimulation of mitochondrial fatty acid oxidation and also to the increase of pro inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) that lead to oxidative stress and are present in the obese condition (Huang ET AL, 2015; Higa ET AL, 2014, Canello, R.; Clement, K., 2006).

As such, the aim of this study was to investigate the effect of two AETP, MICT and HIIT, on parameters of oxidative stress, such as TBARS, total sulfhydryl content and total carbonyl content, to correlate with pro-oxidant factors, and on the activity of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px) in the blood/plasma and liver of rats submitted to HFD, with the intention of minimizing the oxidative stress caused in this condition.

This study revealed that HFD significantly enhanced TBA-RS and protein carbonyl content and reduced total sulfhydryl content in the HFD-UNT group, when compared to the ND-UNT group. These data, corroborates to Yida et al (2015) findings, where HFD feeding caused inflammation and oxidative stress in liver and kidney of rats. In the present study, the protocols of MICT and HIIT prevented the increase in TBA-RS, partially the alteration in protein carbonyl content, however weren't able to prevent the reduction in the total sulfhydryl content in the HFD group. TBA-RS reflect the content of malondialdehyde, the most abundant individual aldehyde that results from lipid peroxidation processes (Halliwell and Whiteman, 2004). In contrast, the level of protein carbonyl and sulfhydryl content is widely used as a marker of oxidative protein damage. Thus, our data indicate that HFD elicits oxidative damage to lipids and proteins in the blood of obese rats, and that the protocols were more effective in protect the damage caused in lipids, protecting against lipid peroxidation.

The antioxidant enzymes are important endogenous defenses required to inhibit the formation of ROS or to promote the removal of free radicals and their precursors. The main antioxidant enzymes are CAT, SOD, GSH-Px and glutathione reductase. CAT is a ferric heme protein that directly catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂). SOD removes the anion superoxide by accelerating the rate of its dismutation to H₂O₂ (Halliwell, 2014). GSH-Px catalyzes the decomposition of H₂O₂ or organic peroxides, using the cofactor glutathione (GSH), which is oxidized (GSSG). To complete the redox cycle, glutathione reductase reduces GSSG to GSH (Young and Woodside, 2001).

With respect to antioxidant enzymes, HFD diminished the activity of CAT and GSH-Px in the HFD-UNT group, when compared to the ND-UNT group, but did not alter SOD activity in the erythrocytes of obese rats. Considering the AETP, the HIIT protocol enhanced the activity of SOD in the group HFD-HIIT, suggesting that this protocol modulate this enzyme activity. Both protocols were able to prevent the reduction of CAT activity observed in the HFD-UNT group and increased the activity of this enzyme when compared to the ND-UNT group; suggesting that the protocols modulate the activity of CAT. By the way, the different protocols didn't prevent the reduction in GSH-Px activity observed in the HFD-UNT rats. This data correlates with the incapacity of the different protocols to prevent the reduction in the total sulfhydryl content, since glutathione (GSH) is a co-factor for this enzyme.

Considering that the HIIT protocol were able to increased the activity of SOD in the erythrocytes, means that this allowed greater removal of superoxide and formation of H_2O_2 , which was detoxified by increasing CAT activity in both AETP (MICT and HIIT), preventing thereby the formation of the hydroxyl radicals, which it is considered the most harmful to the cells. The increase in CAT activity, caused by different protocols, may be occurred in function of reduction in GSH-Px activity, since the AETP with both protocols weren't prevent this alteration.

Since oxidative stress results from an imbalance between the total antioxidant defense of the tissue and the reactive species generated, our present data strongly indicate that obesity provokes oxidative stress in the blood of rats, which induces oxidation of lipids and proteins and changes in CAT and GSH-Px activities. Our data also indicate that exercise influence in a positive way, minimizing oxidative stress and modulating antioxidant activity. These results corroborate with the Shing et al (2007) study where eight highly-trained male cyclists enhanced resting plasma total antioxidant status concentration and reduced the post-exercise increase in plasma MDA concentrations after three days of high-intensity exercise.

Furthermore, this study also showed that HFD increased protein carbonyl content, but did not alter TBA-RS, total sulfhydryl content and the activity of SOD in the HFD-UNT group, when compared to the ND-UNT group in the liver of rats. In addition, both AETP (MICT and HIIT) preventing the increase in protein carbonyl content, and did not alter the others parameters analyzed.

In relation to CAT and GSH-Px activities, HFD increased CAT and decreased GSH-Px activities in the HFD-UNT group, when compared to the ND-UNT group. The increase in CAT activity probably occurred to compensate the reduction in GSH-Px activity caused by HFD. The

MICT protocol (HFD- MICT) prevented the alteration in CAT activity, when compared to HFD-UNT group, while the HIIT protocol did not prevent this alteration. Furthermore, the different AETP (MICT and HIIT) weren't able to prevent the reduction in GSH-Px activity in the liver of obese rats. These results showed that the MICT protocol modulate the activity of CAT in the liver of obese rats, preventing the increase in the levels of H₂O₂, which increase the levels of hydroxyl radicals, that causes damage to proteins, lipids and DNA, suggesting that the MICT protocol is more effective than the HIIT protocol to prevent this alteration and minimize injury to the tissue.

Our results corroborate to the studies of Pimenta et al (2015), which showed that HFD exacerbates the deleterious effect of free radicals. Also, reported that the HIIT protocol increases the immune defenses, causing increased resistance to infectious diseases (Pimenta et al (2015). According to Aguiar and Pinho (2007), performing aerobic exercise training increases the antioxidant defenses, which is correlated to morphological and functional adaptations that give adaptation of the organism against oxidative stress.

In conclusion, our study showed that HFD elicits oxidative stress in the blood and liver of rats. Moreover, both AETP (MICT and HIIT) were able to prevent most of the alterations caused by HFD in oxidative stress parameters tested, inducing similar beneficial effects on redox homeostasis. However, further studies are necessary to evaluate which configuration of physical exercise session (type, duration, intensity), could be useful as a potential adjuvant for the prevention of obesity and oxidative stress induced by obesity in humans.

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.

ATTACHMENT

FIGURE 1:

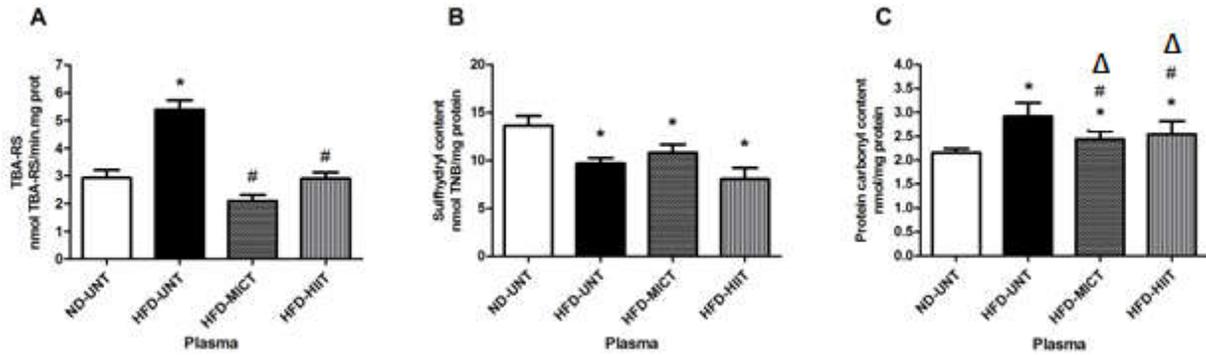


Figure 1. Oxidative stress parameters, (A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); (B) Total Sulphydryl Content; and (C) Protein carbonyl Content in the plasma. The experimental animals were divided into four groups: ND-UNT (normal-diet untrained; n=6), HFD-UNT (high-fat diet untrained; n=6), HFD-MICT (high-fat diet + Moderate-intensity continuous training; n=6) and HFD-HIIT (high-fat diet + High-intensity interval training; n=6). The data are presented as mean \pm SEM and were compared between groups by one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Duncan. *, $p < 0.05$ vs. ND-UNT; #, $p < 0.05$ vs. HFD-UNT. Δ , $p < 0.05$ vs. ND-UNT and HFD-UNT.

FIGURE 2:

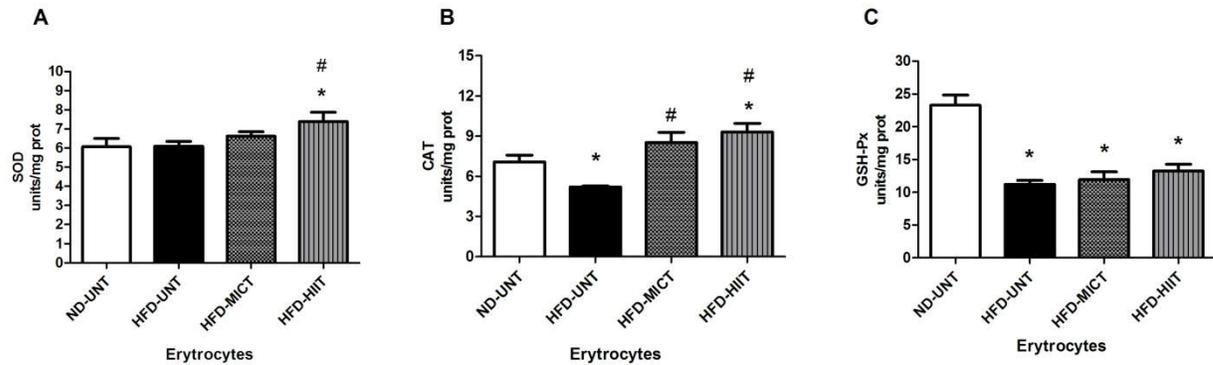


Figure 2. Antioxidant enzymes, (A) Superoxide dismutase (SOD), (B) catalase (CAT) and (C) Glutathione Peroxidase assay (GSH-Px) in the erythrocytes. The experimental animals were divided into four groups: ND-UNT (normal-diet untrained; n=6), HFD-UNT (high-fat diet untrained; n=6), HFD-MICT (high-fat diet + Moderate-intensity continuous training; n=6) and HFD-HIIT (high-fat diet + High-intensity interval training; n=6). The data are presented as mean \pm SEM and were compared between groups by one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Duncan. *, $p < 0.05$ vs. ND-UNT; #, $p < 0.05$ vs. HFD-UNT.

FIGURE 3:

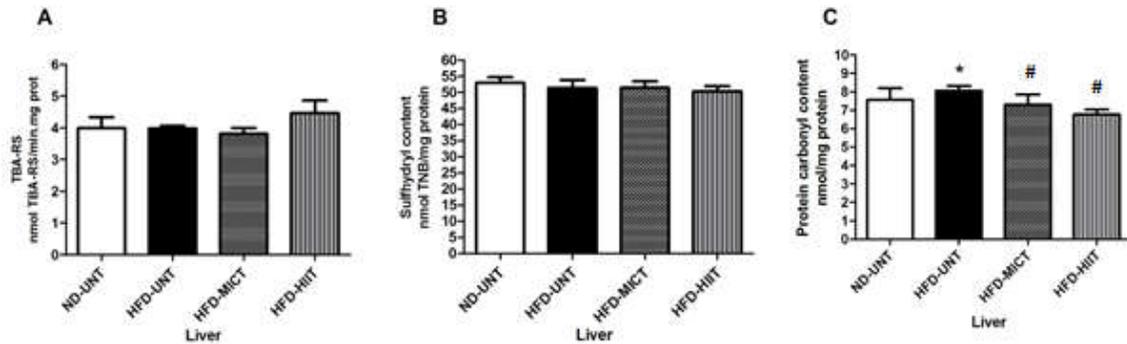


Figure 3. Oxidative stress parameters, (A) -Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); (B) Total Sulphydryl Content; and (C) Protein carbonyl Content) in the liver. The experimental animals were divided into four groups: ND-UNT (normal-diet untrained; n=6), HFD-UNT (high-fat diet untrained; n=6), HFD-MICT (high-fat diet + Moderate-intensity continuous training; n=6) and HFD-HIIT (high-fat diet + High-intensity interval training; n=6). The data are presented as mean \pm SEM and were compared between groups by one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Duncan. *, $p < 0.05$ vs. ND-UNT; #, $p < 0.05$ vs. HFD-UNT.

FIGURE 4:

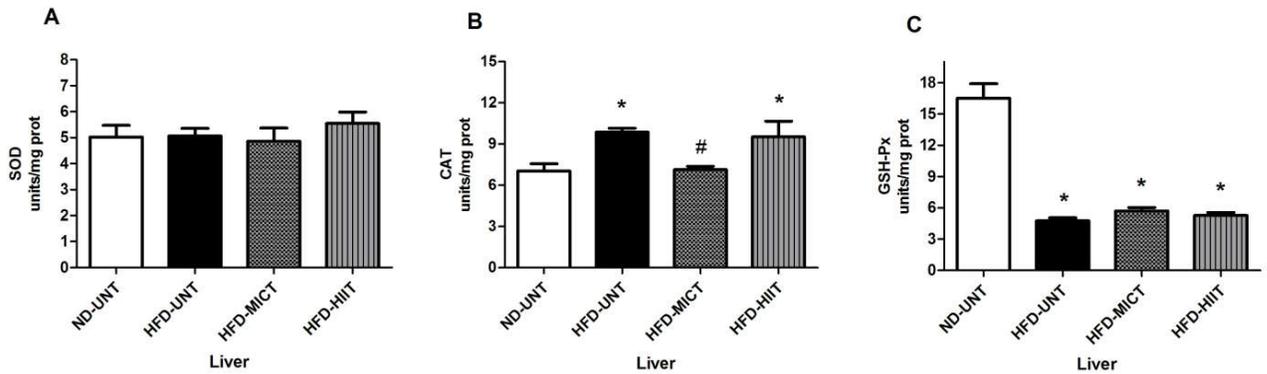


Figure 4. Antioxidant enzymes, (A) Superoxide dismutase (SOD), (B) catalase (CAT) and (C) Glutathione Peroxidase assay (GSH-Px) in the liver. The experimental animals were divided into four groups: ND-UNT (normal-diet untrained; n=6), HFD-UNT (high-fat diet untrained; n=6), HFD-MICT (high-fat diet + Moderate-intensity continuous training; n=6) and HFD-HIIT (high-fat diet + High-intensity interval training; n=6). The data are presented as mean \pm SEM and were compared between groups by one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Duncan. *, $p < 0.05$ vs. ND-UNT; #, $p < 0.05$ vs. HFD-UNT.

REFERENCES

- Aebi H. Catalase in Vitro. *Method Enzym*, v. 105, p.121-126, 1984.
- Aguiar Jr, A. S.; Pinho, R. A. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. *Rev Bras Med Esporte*. v. 13, n. 5, 2007.
- 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. *Neurosci Lett* v.302, p.141–145, 2001.
- Amorim, P. R. S.; Faria, F. R. X. Dispendio energético das atividades humanas e sua repercussão para a saúde. *8, 8(S2)*, 295–302. *Motricidade*. v. 8, p. 295-302, 2012.
- Barreiros, A.L.B.S.; David J.M.; David J.P. Oxidative Stress: Relations Between the Formation of Reactive Species and the Organism's Defense. *Química Nova*. v.29, n.1. São Paulo, 2006.
- Bolner, A.R. Evidência Clínica (conciso). *A Fonte Internacional das Melhores Evidências Disponíveis para Cuidados de Saúde Efetivos*. British Medical Journal, 11^{ed}. Artmed. Porto alegre-RS: 2006.
- Brewis, A. A. Obesity. Cultural and Biocultural Perspectives. Rutgers University Press. New Brunswick, New Jersey and London, 2011.
- Burgomaster, K.A., Howarth, K.R., Phillips, S.M., Rakobowchuk, M., Macdonald, M.J., McGee, S.L., Gibala, M.J., 2008. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J. Physiol*. 586, 151–160.
- Chalimoniuk, M; Jagsz, S; Sadowska-krepa, SJ; Chrapusta, SJ; Klapcinska, B; Langfort, J. Diversity of endurance training effects on antioxidant damage in different brain regions of adolescent male rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2015. 539-547
- Coutinho, W. F. Consenso Latino Americano em Obesidade. *The journal of pediatrics*, v. 149, p. 809- 16, 2006. Disponível em: ><http://www.abeso.org.br>. Acesso em: 24/05/2015. <http://www.inca.gov.br>.
- Eiholzer, U.;I Allemand, D.;Zipf, W.B. Prader-Willi Syndrome as a Model for Obesity: International Symposium, Zurich, October 18-19, 2002.
- Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. Radicais livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras*. vol.43 n.1 São Paulo, 1997.
- Ferreira, J. C. B.; Rolim, N. P. L.; Batholomeu, J. B.; Gobatto, C. A.; Kokubun, E.; Brum, P.C. Maximal lactate steady state in running mice: effects of exercise training. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Victoria, v. 34, p. 760-765, 2007.
- Fox, S. *Human Fysiology*. 9th ed. New York: Mcgraw-Hill Companies, 2006.
- Gibala MJ, Little PJ, van Essan M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, Raha S & Tarnopolsky MA (2006a). Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance.

- Gómez-Cabello, A. *et. al.* Sitting time increases the overweight and obesity risk independently of walking time in elderly people from Spain. *Maturitas*, 73(4), p. 337–343, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.maturitas.2012.09.001>
- Halliwell, B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J. Department of Biochemistry, National University of Singapore*, 37(3): 99- 105. 2014. doi:10.4103/2319-4170.128725.
- Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231–55. 2004. doi:10.1038/sj.bjp.0705776.
- Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MO, Al-Share QY, Waldum HL, Gilligan LJ, Kock LG, Britton SL, Najjar SM, And Wisloff U. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc Res* 81: 723-732, 2008.
- Harman, D. The Free Radical Theory of Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 5, n. 5, 2003.
- Jacobs, S. Consequências do consumo materno de dieta de cafeteria sobre o perfil endócrino e a função reprodutiva da prole. Universidade Federal do Rio grande do Sul. Instituto de Ciências Biológicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Porto Alegre, 2013.
- Kumar, V.; Abbas, K. A.; Aster, C. J. Robbins. *Patologia Básica*. Department of Pathology. University of California San Francisco, 9ª. ed. Elsevier, 2013.
- Louzada, S. M.; Guilherme, C.; Machado, F. de S.; Araújo, A. S.; Sanvitto, G. L.; Funchal, C. Efeito da obesidade induzida pela dieta da cafeteria sobre os parâmetros oxidativos no ovário de ratas. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 92-102, apr. 2013. ISSN 2238-1589. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/RESBCAL/article/view/16195>>. Acesso em: 07 aug. 2016.
- Lowry O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *Protein Measurement*. 1951.
- Lyra, H. F. J. Avaliação da expressão imuno-histoquímica das células retais produtoras de grelina em ratos Wistar submetidos à Dieta de Cafeteria. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas. Florianópolis 2012.
- Marklund, S. *Pyrogallol Autooxidation*. Handbook of Methods for Oxygen Radical, 1985.
- Mayer, B. *Nitric oxide*. Springer. Department of pharmacology and toxicology, Austria, 2000.
- Melo, E. A. *Guia alimentar para a população brasileira*. Ministério da Saúde. 2ª ed. Brasília-DF, 2014
- Menezes, E. F. Efeito da Indução de Obesidade pela Dieta de Cafeteria a Partir dos 21 dias de idade sobre a estrutura e o desenvolvimento folicular de ratas Wistar. Universidade Federal do Rio grande do Sul. Instituto de Ciências Biológicas da Saúde; Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Porto Alegre, 2010.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* v. 95, p. 351-358, 1979.
- OMS. *Relatórios Mundiais da Saúde*, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>. Acesso em: 15/ 08/2015.

- Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, et al. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. *Eur J Appl Physiol* 2004;91:622–7.
- Pimenta, M.; Bringhentii, S.; Mello, V. S.; Mendes, I. K. S., Aguila M. B., Lacerda, C. A. M. DE-. High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. *Life Sciences*, Oct 15, 2015, Vol.139, p.75(8).
- Polidori MC, Mecocci P, Cherubini A, Senin U. (2000). Physical activity and oxidative stress during aging. *Int J Sports Med*, 21:154–7.
- Powers, S. K.; Howley, E. T. *Fisiologia do Exercício - Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho*. 6ª ed. Manole, 2009.
- Quintanilha AT & Packer L (1983). Vitamin E, physical exercise and tissue oxidative damage. *Ciba Found Symp* 101, 56–69
- Radak, Z.; Kaneko, T.; Tahara, S.; Nakamoto, H.; Sasvari, M.; Nyakas, C.; Goto, S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem. Int.* 38:17–23; 2001
- Reznick AZI, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* v. 233, p. 357-63, 1994.
- Russel, J. B. *Química Geral*, v.1, 2ª ed..Pearson Makron Books. São Paulo: 1994.
- Sassi, F. *Obesity and the Economics of Prevention: Fit Not Fat*. OECD, p.24-44, 2010.
- Shing, CM; Peake, JM;Ahern, SM; Strobel, NA; Wilson, G; Jenkins, DG; Coombes, JS. The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*. 2007. 32. 677-85
- Sijie, T.; Hainai, Y.; Fengying, Y.; Jianxiong, W. High Intensity Interval Exercise Training in Overweight Young Women. *J Sports Med Phys Fitness*, 52: 255-62, 2012.
- Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 50: 635-639
- Sugama K; Suzuki, K; Yoshitani K; Shiraishi K; Miura S; Yoshioka H; Mori Y; Kometani T . Changes of thioredoxin, oxidative stress markers, inflammation and muscle/renal damage following intensive endurance exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2015;21:130-42.
- Tomao, F.; Papa, A.; Zaccarelli, E.; Rossi, L.; Caruso, D.; Minozzi, M.; Vici, P.; Frati, L.; Tomao, S. Triple-Negative Breast Cancer: New Perspectives for Targeted Therapies. *Onco Targets Ther.* V.8, p.177–193. 2015. DOI: 10.2147/OTT.S67673.
- Viuniski, N. Epidemiologia da Obesidade e Síndrome Plurimetabólica na Infância e Adolescência. In: DÂMASO, A. *Obesidade*: p. 16-31. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.
- Wendel, A. Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.* v.77 p.325-333, 1981.
- Yida, Z; Imam, MU; Ismail, M; Ismail, N; Ideris, A; Abdullah, MA. High fat diet-induced inflammation and oxidative stress are attenuated by N-acetylneuraminic acid in rats. *Journal of biomedical science*. 2015. 22. 1. 96
- Young, I.S.; Woodside, J. V. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* v. 54, p. 176–186, 2001.

5.2 ARTIGO 2: EFFECTS OF TWO AEROBIC EXERCISE TRAINING PROTOCOLS ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN SKELETAL MUSCLE OF OBESE RATS

EFFECTS OF TWO AEROBIC EXERCISE TRAINING PROTOCOLS ON PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN SKELETAL MUSCLE OF OBESE RATS

Ariene Sampaio Souza Farias Ulbricht¹, Daniela Delwing-de Lima^{1,2*}, Carla Werlang-Coelho^{3,4}, Débora Delwing-Dal Magro⁵, Bruna Donat³, Mariana Ramos Vieira², Marina Zordan Poletto², Eduardo Manoel Pereira⁵

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

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

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

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

⁵ 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.

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

* Address for correspondence: Dr. Daniela Delwing de Lima, Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br

ABSTRACT

We evaluated the effects of two aerobic exercise training protocols (AETP), the moderate-intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT), on the alterations caused by high-fat diet (HFD) on oxidative stress parameters in the skeletal muscles of rats. First of all, animals received 8 weeks of HFD or normal-diet (ND); then, plus more 9 weeks of HFD or ND and two AETP. Results showed that HFD did not alter TBA-RS in the soleus and plantar muscles, also did not alter total sulfhydryl content, but regarding the protocols of AET (HIIT and MICT) caused a significantly decrease in TBA-RS levels in the plantar muscle, when compared to HFD-UNT group. HFD did not alter total sulfhydryl content in the soleus and plantar muscles, but both protocols of AET (HIIT and MICT) increased total sulfhydryl content in the soleus muscle and the protocol of MICT also increased total sulfhydryl content in the plantar muscle. HFD did not alter this parameter of protein carbonyl content in soleus and plantaris muscles when compared to the control groups (ND-UNT) and also did not alter HIIT protocol. HFD did not alter SOD activity in the soleus muscle in the HFD-UNT group, but reduced significantly this enzyme activity in the plantar muscle when compared to the ND-UNT group. HFD enhance SOD activity in the soleus muscle in the MICT group, when compared to the UNT group. Both protocols were able to revert the decrease in SOD activity caused by HFD in the plantar muscle. HFD increased significantly CAT activity in the soleus muscle in the UNT group when compared to the ND group, but did not alter this enzyme activity in the plantar muscle. The HIIT protocol prevented this alteration in the soleus muscle, when compared the result to the HFD-UNT group. both protocols increased significantly the activity of CAT (HFD-MICT and HFD-HITT groups) when compared to the ND-UNT and HFD-UNT group, in the plantar muscle. HFD reduced significantly activity of the enzyme GSH-Px in both muscle in the UNT group, when compared to the ND-UNT group. The MICT protocol prevented this reduction and the HIIT protocol partially prevented, when compared to HFD-UNT group, in the soleus muscle. Considering plantaris muscle, while the MICT protocol did not prevent the reduction in GSH-Px activity, the HIIT protocol could partially prevent when compared to HFD-UNT group. In conclusion, our study showed that HFD elicits oxidative stress in the skeletal muscle of rats and that both protocols of AETP (MICT and HIIT) were able to prevent most of the alterations caused by HFD in the oxidative stress parameters tested.

Keywords: Aerobic exercise training protocols, oxidative stress, skeletal muscles.

INTRODUCTION

Obesity is a chronic disease, whose determinant is the excessive accumulation of triglycerides in adipose tissue, due to the energy imbalance between greater intake of foods with high fat and sugar content and a reduced energy consumption, which can be measured by the Index Body mass (BMI). Obesity has complex etiology, due to its multifactorial aspect, a result of interactions between genetic, metabolic and environmental factors (Curi et al, 2007).

Simultaneously, obesity is also a risk factor for various cardiovascular diseases, such as hypertension and atherosclerosis, and metabolic endocrine-diseases, such as diabetes mellitus type 2. The interaction is a consequence of abnormal bio-metabolic process, including, endothelial dysfunction influenced by the lipid profile, glycemic, and distribution of solutes and water. Obesity is also associated with induction of cellular events that lead to mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS), via respiratory chain (Amarante et al, 2007; Bonetti et al, 2003). According to Pimenta et al. (2015), the high fat diet exacerbates the deleterious effects of free radicals in animal model using rats.

Data from the literature show that multiple therapies have been suggested and used to reduce the harmful results of obesity and its comorbidities, among them are the conduits addressed to minimize the deleterious effects on the cellular level, and therefore systemic, such as physical exercise, which is appropriate in most cases as non-drug therapy to prevent and treat obesity and its metabolic and physical-cell complications (Harman, 2003; Sassi 2010; Amorim et al., 2012).

Studies have proven that regular physical activity and systematic is beneficial in the prevention and rehabilitation of damage to health, since it helps in metabolic control, activating and amplifying the functioning of all organs, through induced adaptations on various body systems. Among the models of exercises, we highlight the interval and continuous (Fox, 2006; Sijie et al, 2012). Interval type training is performed intermittently, being characterized by alternating periods of exercise, combined with rest intervals, since the continuous training is characterized by the execution of low and medium intensity exercise, for a period of time, with only a recovery interval, occurring after termination (Almeida and Pires, 2008; Astorino et al, 2013; Pimenta et al, 2015).

Considering the high global rates of obesity, associated with physical inactivity and dietary changes resulting from population lifestyle, this study aimed to evaluate the effects of two aerobic exercise training protocols (AETP), the moderate-intensity continuous training (MICT) and high-

intensity interval training (HIIT), on the alterations caused by high-fat diet (HFD) on oxidative stress parameters in the soleus and plantar muscles of 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, were randomly assigned into HFD (protein, 20%; carbohydrate, 20%; and, lipid, 60% - Prag Soluções Biosciências, Jaú-SP) or normal diet (ND) (protein, 20 kcal%; carbohydrate, 70 kcal%; and, lipid, 10 kcal%; - Nuvital Nutrientes, Curitiba-PR) during 8 weeks. The rats were maintained in a light-dark inverted cycle (12:12-h light-dark cycle), temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), controlled environment 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 trained with different AETP as follow: HFD-MICT, n=6 and HFD-HIIT, n=6. Animals from the ND were assigned to one untrained group (ND-UNT; n=6). After this phase, these 4 experimental groups had more 9 weeks of diet and training. AETP are described in detail below. All rats were euthanized three days post last day training. 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. 002/213 – COEA). All chemicals used in the analysis of oxidative stress parameters were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Aerobic Exercise Training Protocols (AETP): (1) Moderate-Intensity Continuous Training (MICT) and (2) High-Intensity Interval Training (HIIT)

Before the AETP, rats were conditioned to treadmill exercises over a period of a week (10 minutes of exercise per session), and in the end of this period, they were submitted a graded treadmill exercise test.

Graded Treadmill Exercise Test: During the test, rats were placed on the treadmill and allowed to acclimatize for at least 10 minutes. Rats ran on a graded treadmill until exhaustion at 20° 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., 1997). The graded treadmill exercise test was performed prior to exercise training and then during the 4th and 8th week of exercise training.

Both AETP consisted of an 8 week program running on a motorized treadmill (KT-4000 model INBRAMED, RS, Brazil), at 20° inclination, 5 days a week.

(1) MICT: was performed at a treadmill speed corresponding to 60% of the maximum running speed obtained in the graded treadmill test, which was kept unchanged throughout the entire session. (2) HIIT was performed in such a way that rats run 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. MICT and HIIT protocols were of matched volume, meaning that total running distances in each session of either MICT or HIIT were identical; therefore, MICT session duration was adjusted to match HIIT distance (Haram et al, 2008). A 5-min warm up at 40% of the maximum running speed was performed by both trained groups before each AETP 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.

Tissue preparation

After decapitation, the skeletal muscle soleus and plantar were removed and kept in ice-cold buffered sodium phosphate (20mM, pH 7.4, 140mM KCl). The skeletal muscle soleus and plantar were homogenized in ten volumes (1:10w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were prepared using a Potter-Elvehjem homogenizer (Remi motors, Mumbai, India); by passing 5 pulses and were centrifuged at 750 x g for 10 min at 4°C to discard nuclei and cell debris (Evelson et al., 2001). The pellet was discarded and the supernatant was saved in aliquots and stored at -80°C for assaying the activity of antioxidant enzymes, damage to proteins and estimation of lipid peroxidation.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS was determined according to the method described by Ohkawa et al. (1979). TBA-RS methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation, caused mainly by hydroxyl free radicals. Tissues were mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBA-RS were determined by 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 content was 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 μ l of homogenate was 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 μ L of 10mM 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 μ L of homogenate were added to plastic tubes containing 400 μ L of 10mM dinitrophenylhydrazine (prepared in 2M HCl). Samples were kept in the dark for 1 h and vortexed every 15 min. Subsequently, 500 μ 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 μ 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 were 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 H₂O₂ at 240 nm in a reaction

medium containing 20mM H₂O₂, 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 1μmol of H₂O₂ 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*-butylhydroperoxide as substrate. NADPH disappearance was monitored at 340nm using a UV–visible Shimadzu spectrophotometer. The medium contained 2mM 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 (O₂^{•-}) which is a substrate for SOD (Marklund, 1985). Briefly, to 15μl of each sample, 215μl of a mixture containing 50μM Tris buffer, pH 8.2, 1μM EDTA and 30μM 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 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.

Protein determination

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

Statistical analysis

The data are presented as means and standard error of the means (mean ± SEM). One-way ANOVA with post hoc testing by Duncan was used to compare the effects of training in all

analyses. Statistical significance was considered achieved when the p-value was <0.05 . We used the statistical program SPSS for Windows version 12.

RESULTS

We initially verified the effect of two protocols of AET, HIIT and MICT, on an important parameter of lipid peroxidation, namely TBA-RS, and on important parameters of protein damage, namely total sulfhydryl content and total carbonyl content in the soleus and plantar muscles of rats submitted to HFD.

Figure 1 shows that HFD did not alter TBA-RS (A) in the soleus and plantar muscles, respectively. Both protocols of AET (HIIT and MICT) did not alter this parameter in soleus muscle, but caused a significantly decrease in TBA-RS levels in the plantar muscle, when compared to HFD-UNT group ($p<0.05$). Furthermore, HFD did not alter total sulfhydryl content (B) in the soleus and plantar muscles. Conversely, both protocols of AET (HIIT and MICT) increased total sulfhydryl content in the soleus muscle and the protocol of MICT also increased total sulfhydryl content in the plantar muscle of rats. Regarding to protein carbonyl content (C), HFD did not alter this parameter in soleus and plantaris muscles when compared to the control groups (ND-UNT) and HIIT protocol, also did not alter this parameter. However, the MICT protocol reduced significantly the levels of protein carbonyl content in both types of skeletal muscles when compared to HFD-UNT group ($p<0.05$).

Subsequently, the effect of two protocols of AET, HIIT and MICT, on antioxidant defenses in the soleus and plantar skeletal muscle homogenates were also investigated, in rats submitted to HFD, by evaluating the activities of antioxidant enzymes, namely SOD, CAT and GSH-Px.

As can be seen in Figure 2, in the soleus muscle, HFD did not alter SOD (A) activity in the HFD-UNT group, but reduced significantly this enzyme activity in the plantar muscle when compared to the ND-UNT group ($p<0.05$). The protocol MICT were able to enhance SOD activity (HFD-MICT group), when compared to the group HFD-UNT in the soleus muscle ($p<0.5$). Both protocols were able to revert the decrease in SOD activity caused by HFD in the plantar muscle of rats ($p<0.05$). With regard to the activity of CAT, Figure 2 (B) shows that HFD increased significantly this activity in the HFD-UNT group when compared to the ND-UNT group, in the soleus muscle ($p<0.05$) and did not alter this enzyme activity in the plantar muscle. The HIIT protocol prevented this alteration in the soleus muscle, when compared the result to the HFD-UNT group ($P<0.05$) and both protocols increased significantly the activity of CAT (HFD-MICT and

HFD-HITT groups) when compared to the ND-UNT and HFD-UNT group, in the plantar muscle ($p < 0.05$). With respect to the activity of the enzyme GSH-Px, Figure 2C shows that HFD reduced significantly this enzyme activity in the HFD-UNT group, in both muscle when compared to the ND-UNT group ($p < 0.05$). The MICT protocol prevented this reduction and the HIIT protocol partially prevented, when compared to HFD-UNT group, in the soleus muscle. Considering plantaris muscle, while the MICT protocol did not prevent the reduction in GSH-Px activity, the HIIT protocol could partially prevent when compared to HFD-UNT group ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Obesity is strongly related with oxidative stress, and the physical exercise that has the ability to increase the energy expenditure body it has been considered as an important resource for prevent or assist in the treatment of obesity, since it also provides a stimulatory effect of the endogenous antioxidant defenses, promoting a balance between the damage induced by pro oxidants and antioxidants repair mechanisms (Cruzat et al, 2007; Pinho et al, 2010).

The aim of the present study was to investigate the effect of two different protocols of AET, HIIT and MICT, on the status of oxidative stress in the soleus and plantar muscles of rats submitted to HFD. The effects of different protocols of AET on these skeletal muscles were studied, since these muscles have important functions that may have been damaged by oxidative stress caused by HFD. We measured different biomarkers of oxidative stress; TBA-RS, total sulfhydryl content, protein carbonyl content, as well as the activities of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GSH-Px. Our study revealed different effects with respect to the different protocols analyzed on the parameters of oxidative stress in the biological samples investigated.

This study revealed that HFD did not alter TBA-RS in the soleus and plantar muscle and that both protocols of AET (HIIT and MICT) also did not alter this parameter in soleus muscle, but cause a decrease in TBA-RS levels in the plantar muscle, when compared to HFD-UNT group. Furthermore, HFD did not alter total sulfhydryl content in the soleus and plantar muscles. Conversely, both protocols of AET (HIIT and MICT) increased total sulfhydryl content in the soleus muscle and the protocol of MICT also increased total sulfhydryl content in the plantar muscle of rats. Regarding to protein carbonyl content (C), HFD did not alter this parameter in soleus and plantaris muscles, when compared to the control groups (ND-UNT), and both protocols also did not alter this parameter. However, the MICT protocol could reduced the levels of protein carbonyl content in both types of skeletal muscles when compared to the HFD-UNT group.

According to our results, although HFD did not alter the levels of TBAR-RS, total sulfhydryl content and the levels of protein carbonyl content, both types of exercise reduced TBARS levels in the plantar muscle, suggesting that aerobic physical activity, in the long term, it is effective to reduce lipid peroxidation in this muscle. In addition, our results suggest that aerobic exercise also prevents protein damage, since both protocols increased total sulfhydryl content in the soleus muscle, and the protocol of MICT increased total sulfhydryl content in the plantar muscle of rats. Corroborating to prevent protein damage, the MICT protocol also showed a tendency to reduce the levels of protein carbonyl content in both types of skeletal muscles.

With respect to antioxidant enzymes, results showed that HFD did not alter SOD activity in the soleus muscle, but reduced this enzyme activity in the plantar muscle. The protocol MICT were able to enhance SOD activity in the soleus muscle and both protocols reverted the decrease in SOD activity caused by HFD in the plantar muscle of rats. With regard to the activity of CAT, HFD increased this enzyme activity in the soleus muscle and did not alter this enzyme activity in the plantar muscle. The protocol of HIIT prevented this alteration in the soleus muscle and both protocols increased the activity of CAT in the plantar muscle. With respect to the activity of the enzyme GSH-Px, HFD reduced this enzyme activity in both muscles and the MICT protocol totally prevented this alteration and the HIIT protocol prevented just partially in the soleus muscle; considering plantaris muscle, the MICT protocol did not prevent the reduction in GSH-Px activity but the HIIT protocol was able to partially prevented this reduction.

Regarding the study of Pimenta et al. (2015), HFD exacerbates the deleterious effects of free radicals. On the other hand, the routine of moderately intense exercise increases the immune defenses. According to the study of Motta et al (2015), in an animal model trained, there was increased expression of antioxidant enzymes and the HIIT model, short-term, attenuated oxidative stress and regulated antioxidant activity, after nine training sessions. In the study of Sechang et al. (2013), physical training was effective in reducing serum levels of inflammation and oxidative stress markers, such as reactive substances to thiobarbituric acid. Also Aguiar and Pinho (2007) showed that performing aerobic exercise training increases the antioxidant defenses, which is correlated to morphological and functional adaptations that give adaptation of the organism against oxidative stress.

According to Powers and Jackson (2008), the antioxidant enzymes in skeletal muscle are not constant and can be modulated by patterns of activity, including intensity, duration and type, resulting in a variability of effects on the antioxidant enzymes. Our results showed that both types

of AET protocols, positively modulated the enzymes SOD and CAT in the skeletal muscles studied, but were less effective in the modulation of GSH-Px enzyme activity. Corroborating with previous studies, our results also suggest that the amount of daily training, the training time, as well as the chosen type of aerobic exercise are essential to positively modulate the process, since both types of aerobic exercise performed correlated inversely with oxidative stress in the muscles evaluated, since they modulate the activity of antioxidant enzymes and showed a tendency to reduce lipid peroxidation and protein damage in the soleus and plantar muscles of rats submitted to HFD.

In conclusion, our findings show that obesity alter the activity of antioxidant enzymes in the soleus and plantar muscles, and that both types of AETP (MICT and HIIT) were effective in modulating the enzymatic system, enabling greater protection to muscles against oxidative damage caused by obesity.

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.

ATTACHMENT

FIGURE 1:

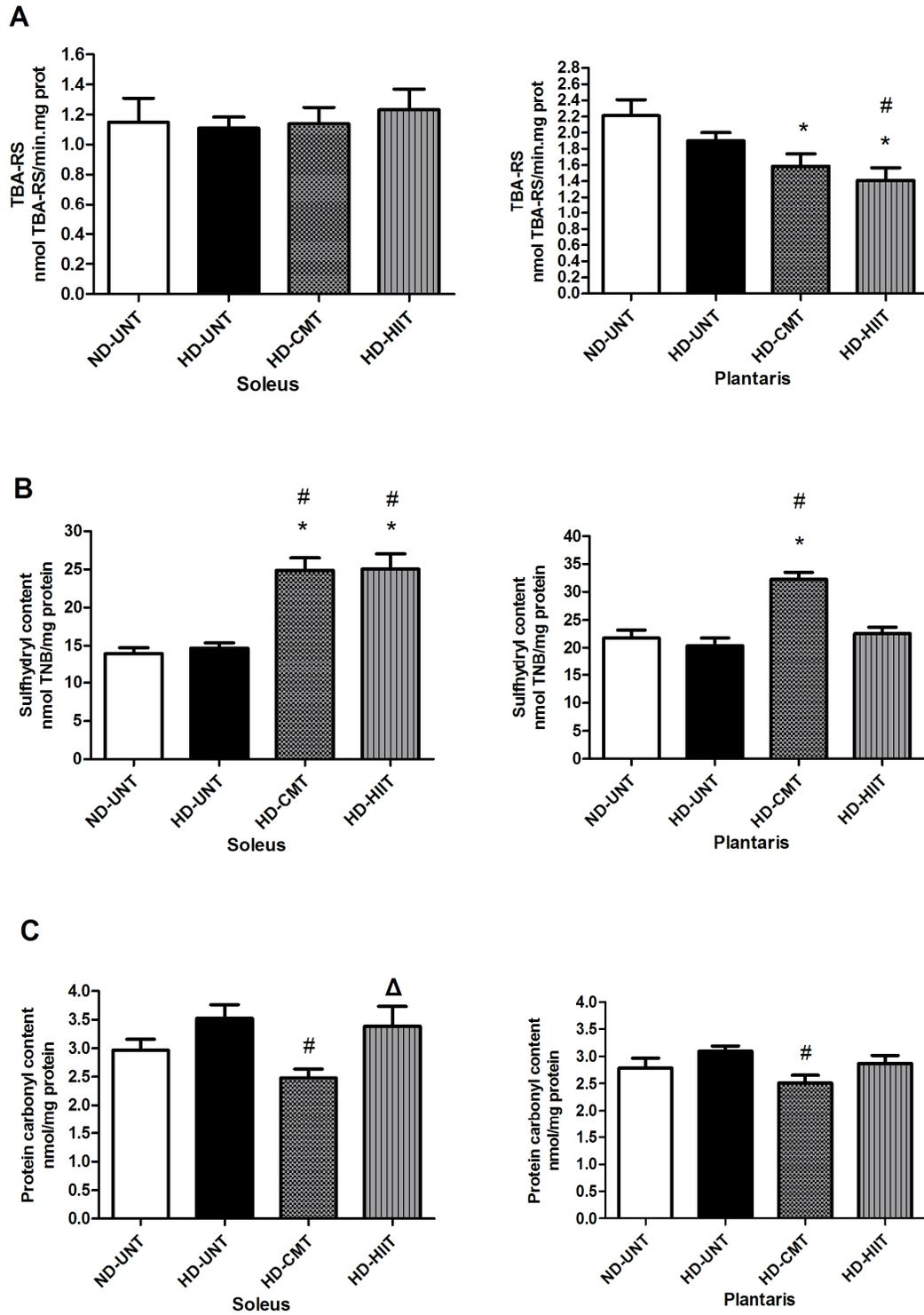


Figure 1. Oxidative stress parameters, (A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); (B) Total Sulfhydryl Content; and (C) Protein carbonyl Content in the soleus and plantaris muscles. The experimental animals were divided into four groups: ND-UNT (normal-diet untrained; n=6), HFD-UNT (high-fat diet untrained; n=6), HFD-MICT (high-fat diet + Moderate-intensity continuous training; n=6) and HFD-HIIT (high-fat diet + High-intensity interval training; n=6). The data are presented as mean \pm SEM and were compared between groups by one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Duncan. *, $p < 0.05$ vs. ND-UNT; #, $p < 0.05$ vs. HFD-UNT; Δ , $p < 0.05$ vs. ND-UNT and HFD-UNT.

FIGURE 2:

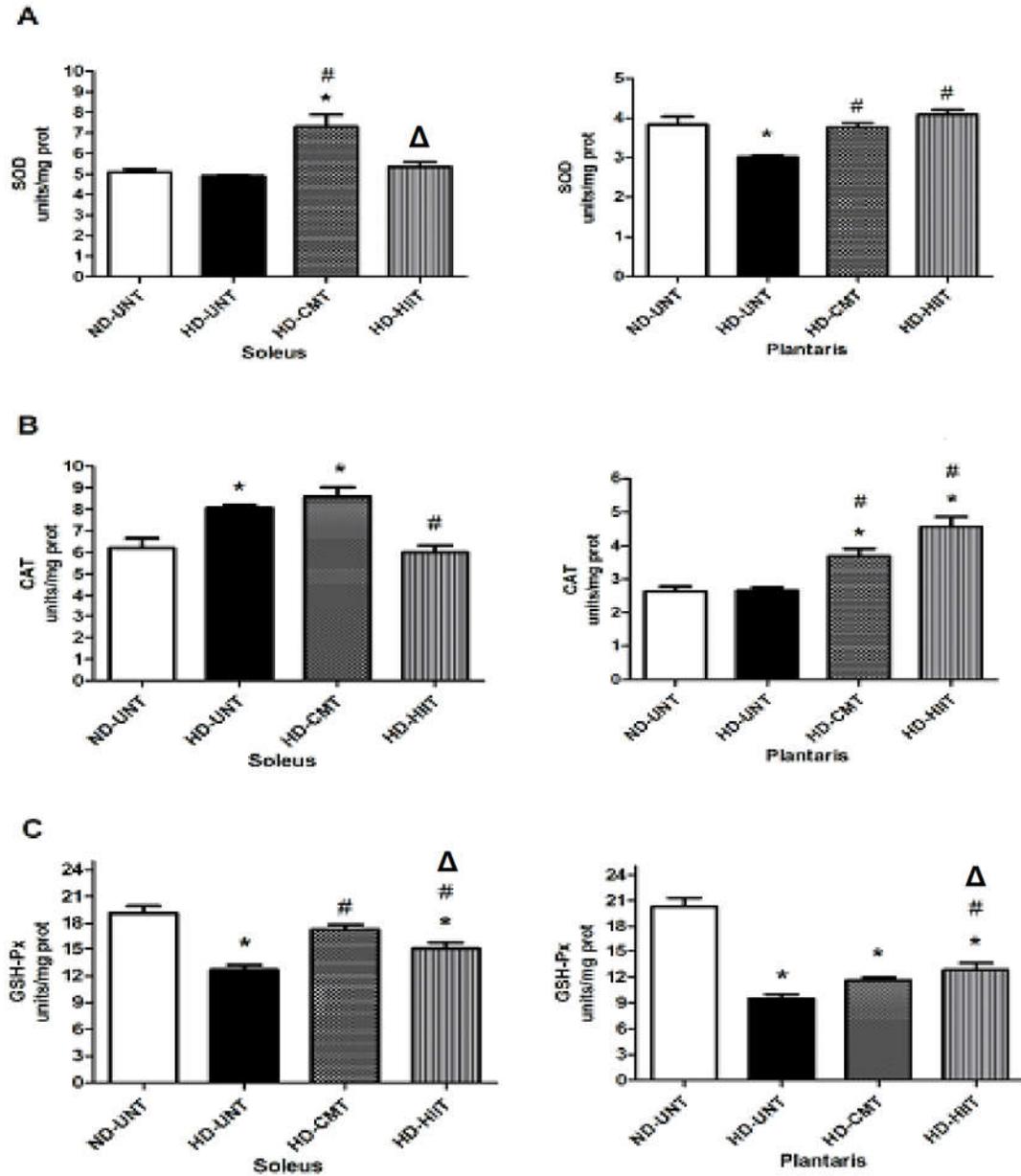


Figure 2. Antioxidant enzymes, (A) Superoxide dismutase (SOD), (B) catalase (CAT) and (C) Glutathione Peroxidase assay (GSH-Px) in the in the soleus and plantaris muscles. The experimental animals were divided into four groups: ND-UNT (normal-diet untrained; n=6), HFD-UNT (high-fat diet untrained; n=6), HFD-MICT (high-fat diet + Moderate-intensity continuous training; n=6) and

HFD-HIIT (high-fat diet + High-intensity interval training; n=6). The data are presented as mean \pm SEM and were compared between groups by one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Duncan. *, p<0.05 vs. ND-UNT; #, p <0.05 vs. HFD-UNT; Δ , p <0.05 vs. ND-UNT and HFD-UNT.

REFERENCES

Aebi H. Catalase in Vitro. *Method Enzym*, v. 105, p.121-126, 1984.

Aguiar Jr, A. S.; Pinho, R. A. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. *Rev Bras Med Esporte*. v. 13, n. 5, 2007.

Aguiar Jr, A. S.; Pinho, R. A. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. *Rev Bras Med Esporte*. v. 13, n. 5, 2007.

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. *Neurosci Lett* v.302, p.141–145, 2001.

Almeida, P.A.; Pires, C.M.R. A importância do Treinamento Intervalado em Programas de Redução de Peso e Melhoria da Composição Corporal. *EFDeportes*. v.13 n.119. Buenos Aires, 2008.

Amarante, R D M. ; Castro, R.; Lage, A.V. ; Cisternas, J. R. Diabetes Mellitus as a risk factor in vascular diseases. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo* 2007; 52(3):87-93.

Amorim, P. R. S.; Faria, F. R. X. Dispendio energético das atividades humanas e sua repercussão para a saúde. 8, 8(S2), 295–302. *Motricidade*. v. 8, p. 295-302, 2012.

Astorino, T.A.; Schubert, M.M.; Palumbo E.; Stirling, D.; Mcmillan, D.W. Effect of Two Doses of Interval Training on Maximal fat Oxidation in Sedentary Women. *MedSci Sports Exerc*. v. 10, p.1878-1886, 2013. DOI: 10.1249/MSS.0b013e3182936261.

Bonetti,P.O; Lerman, L.O, Lerman, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. [Review] *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:168-75

Cancello, R.; Clement, K. Review article: Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. v. 113, p. 1141–1147, 2006

Cruzat, V.F. ,Rogero, M.M. ,Borges, M.C. ,Tirapegui, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Rev Bras Med Esporte* 13 (5), 336-42, 2007.

Curi, R.; Miyasaka, C.K.; Pompéia, C.; Procópio, J. Entendendo a Gordura. *Os Ácidos Graxos*. Manole, 2007.

Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi E. (2001) Evaluation of total reactive antioxidant potential (trap) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 388: 261–266.

- Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. Radicais livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. Rev. Assoc. Med. Bras. vol.43 n.1 São Paulo, 1997.
- Fox, S. Human Physiology. 9th ed. New York: Mcgraw-Hill Companies, 2006.
- Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MO, Al-Share QY, Waldum HL, Gilligan LJ, Kock LG, Britton SL, Najjar SM, And Wisloff U. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. Cardiovasc Res 81: 723-732, 2008.
- Harman, D. The Free Radical Theory of Aging. Antioxidants & Redox Signaling, v. 5, n. 5, 2003.
- Higa, Talita S., et al. "Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice." International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology 6.1 (2014): 47-54.
- Huang C-J, McAllister MJ, Slusher AL, Webb HE, Mock JT, Acevedo EO. Obesity-Related Oxidative Stress: the Impact of Physical Activity and Diet Manipulation. Sports Medicine - Open. 2015;1:32. doi:10.1186/s40798-015-0031-y.
- Lowry O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement. 1951.
- Marklund, S. Pyrogallol Autooxidation. Handbook of Methods for Oxygen Radical, 1985.
- Motta, V.F.; Aguila, M.B.; Lacerda, M. C.A. de. High-intensity interval training (swimming) significantly improves the adverse metabolism and comorbidities in diet-induced obese mice. J. Sports Med. Phys. Fitness, 2015.
- Motta, V.F.; Aguila, M.B.; Lacerda, M. C.A. de. High-intensity interval training (swimming) significantly improves the adverse metabolism and comorbidities in diet-induced obese mice. J. Sports Med. Phys. Fitness, 2015.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979, 95:351-358.
- Pimenta, M.; Bringham, S.; Mello, V. S.; Mendes, I. K. dos S., Aguila M. B., Lacerda, C. A. M. DE-. High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. Life Sciences, Oct 15, 2015, Vol.139, p.75(8).
- Pinho R A, Silva L A, Pinho C A, ET AL. Oxidative stress and inflammatory parameters after an Ironman race. Clin J Sport Med. 2010. 20:306-311.
- Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. Physiol Rev 88:1243–1276
- Reznick AZ1, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymol. v. 233, p. 357-63, 1994.
- Sassi, F. Obesity and the Economics of Prevention: Fit Not Fat. OECD, p.24-44, 2010.
- Sechang, OH; Kiyoji, T.; Eiji, W. ; Junichi, S. Exercise reduces inflammation and oxidative stress in obesity-related liver diseases Medicine and science in sports and exercise, December 2013, Vol.45(12), pp.2214-22.

Sechang, OH; Kiyoji, T.; Eiji, W. ; Junichi, S. Exercise reduces inflammation and oxidative stress in obesity-related liver diseases *Medicine and science in sports and exercise*, December 2013, Vol.45(12), pp.2214-22.

Sijie, T.; Hainai, Y.; Fengying, Y.; Jianxiong, W. High Intensity Interval Exercise Training in Overweight Young Women. *J Sports MedPhys Fitness*, 52: 255-62, 2012.

Wendel, A. Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.* v.77 p.325-333, 1981.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estilo de vida sedentário e a alimentação hiperlipídica e hipercalórica estilo “Cafeteria”, “fast food” ou “junk foods” vivenciados pelo homem moderno, tem provocado diversas disfunções biológicas e por consequência a predisposição e fatores importantes de risco para diversas doenças crônicas não transmissíveis, entre elas a obesidade, suas comorbidades, e as consequências deletérias á nível celular pela geração de radicais livres em excesso que levam ao estresse oxidativo.

Hoje a obesidade é um grande problema de saúde pública que atinge um patamar de pandemia mundial. Além do impacto sobre a saúde pessoal, a doença também afeta toda a sociedade gerando um ônus socioeconômico elevadíssimo, esse é um assunto muito relevante e carente de medidas para revertê-lo.

Diversas maneiras de tratar e prevenir a obesidade estão em estudo, entre elas a reorganização do comportamento pessoal, associando a redução da ingestão de energia em calorias e utilizando de um meio não farmacológico e não invasivo que diz respeito ao aumento do gasto energético por meio de atividades físicas.

O presente estudo avaliou a combinação de dieta hiperlipídica e exercício físico inferindo que foi possível comprovar a eficiência da dieta hiperlipídica sem exercício, em induzir estresse oxidativo no sangue, fígado e músculo esquelético de ratos; e também demonstrando que na aplicação e posterior avaliação dos efeitos de dois protocolos de TFA de intensidade contínua e moderada (TC) e intervalado de alta intensidade (HIIT), evidenciou-se que ambos foram capazes de evitar a maior parte dos efeitos negativos causados pela DHL em parâmetros de estresse oxidativo.

7 REFERÊNCIAS

AEBI H. **Catalase in Vitro**. Method Enzym 105:121-126, 1984.

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. **Neurosci Lett** 302: 141–145, 2001.

ALMEIDA, P.A.; PIRES, C.M.R. A importância do treinamento intervalado em programas de redução de peso e melhoria da composição corporal. **EFDeportes**. v.13 n.119. Buenos Aires, 2008.

AMORIM, P. R. S.; FARIA, F. R. x. Dispendio energético das atividades humanas e sua repercussão para a saúde. 8, 8(S2), 295–302. **Motricidade**. v. 8, p. 295-302, 2012.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Rev Inst Adolfo Lutz, v. 66(1), p. 1-9, 2007

AYALA, A. MUÑOZ M. F. ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Volume 2014 (2014), Article ID 360438, 31 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>.

BARREIROS, A. L. B. S.; David, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID J.M.; DAVID J.P. Oxidative Stress: Relations Between the Formation of Reactive Species and the Organism's Defense. **Química Nova**. v.29, n.1. São Paulo, 2006.

BARRY, M P.; COLLEEN, M. D. The Obesity Epidemic Is a Worldwide Phenomenon. **Nutrition Reviews**. v. 56, n. 4, p. 106-114, 1998.

BARTOSZ, G. Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological, and Functional Properties. **CRC Press**. Taylor e Francis Group, 2013.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C; ANTUNES, L.M.G; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr**. v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENITE-RIBEIRO, S. A.; PUTT, D. A.; SANTOS, M. The effect of physical exercise on orexigenic and anorexigenic peptides and its role on long-term feeding control. **Medical Hypotheses**, v. 93, p. 30–33, 2016.

BERTOLUCI, M. C. et al. Diabetes and cardiovascular disease: from evidence to clinical practice – position statement 2014 of Brazilian Diabetes Society. **Diabetology & Metabolic Syndrome**. v. 6:58. p. 1-18, 2014.

BOLNER, A.R. Evidência Clínica (conciso). A fonte internacional das melhores evidências disponíveis para cuidados de saúde efetivos. **British Medical Journal**, 11ª ed. Artmed. Porto Alegre- RS: 2006.

BRAGA, L. R.; DE MELLO, M. A. R.; GOBATTO, C. A. Exercício contínuo e intermitente: Efeitos do treinamento e do destreinamento sobre a gordura corporal de ratos obesos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 54, n. 1, p. 58-65, 2004.

BRASIL. **Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos não Transmissíveis. Brasil, 15 capitais e Distrito Federal.** Ministério da Saúde. Brasil, 2003.

BROWN, T.; SMITH, S.; BHOPAL, R.; KASIM, A.; SUMMERBELL, C.; HILLS, A.A. Diet and Physical Activity Interventions to Prevent or Treat Obesity in South Asian Children and Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Environ Res Public Health**. V. 12(1), p. 566–594, 2015. doi: 10.3390/ijerph120100566

BRUM, P.C.; FORJAZ, C.L.DE M.; TINUCCI, T.; NEGRÃO, C.N. **Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular.** 2004, Escola de Educação Física e Esporte da USP.

CAMARGO, R. L. **Suplementação de taurina em animais desnutridos obesos: análise dos mecanismos moleculares da ação hipotalâmica da insulina e leptina e repercussões no metabolismo energético** (Tese de Doutorado)., Campinas, 2014.

CARVALHO, J.M. et al. Perfil dos principais componentes em bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 65(2), p.7885, 2006.

CASAS R, ESTRUCH R (2016) Dietary Patterns, Foods, Nutrients and Chronic Inflammatory Disorders. *Immunome Res* 12: 122. doi: 10.4172/1745-7580.10000122
CASPERSEN, Carl J., Kenneth E. Powell, and Gregory M. Christenson. "Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research." **Public health reports** 100.2 (1985): 126.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H.G.de; OHARA, A. **Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas.** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo – SP, Brasil, 2007.

COUTINHO, W. Ferreira. Consenso Latino Americano em Obesidade. **The journal of pediatrics**, v. 149, p. 809- 16, 2006. Disponível em: > <http://www.abeso.org.br>. Acesso em: 24/05/2016. <http://www.inca.gov.br>

CRUZAT, V. F., ROGERO, M. M.; BORGES, M. C.; TIRAPEGUI, J. **Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação.** *Rev Bras Med Esporte*;13:304e-10e, 2007.

DE ANGELIS, R. C. Compostos Bioativos e Antioxidantes nos alimentos. **Rev Nutr em Pauta**, v.65, p.6-11, 2004.

- DE LUCAS, R. D.; DENADAI, B. S.; GRECO, C. C. Respostas fisiológicas durante o exercício contínuo e intermitente: implicações para a avaliação e a prescrição do treinamento aeróbio. **Motriz-Revista de Educação Física**. Rio Claro: Univ Estadual Paulista-unesp, Inst Biociencias, v. 15, n. 4, p. 810-820, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/20778>>.
- DEICHMANN, R.; LAVIE, C.; ANDREWS, S.. Coenzyme Q10 and Statin-Induced Mitochondrial Dysfunction. **Journal List Ochsner J**, v.10, p. 16–21, 2010.
- DOGRA, S.; STATHOKOSTAS, L. Sedentary behavior and physical activity are independent predictors of successful aging in middle-aged and older adults. **Journal of Aging Research**, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/190654>
- DORMANDY, T.L. An Approach To Free Radicals.**The Lancet**,v.322, p.1010-1014, 1983.
- DRISKELL, R.R.; JAHODA, C.A.; CHUONG, C.M.; WATT, F.M.; HORSLEY, V. **Defining dermal adipose tissue**. *Exp. Dermatol*, 23:629–31, 2014.
- DUZZIONI, A.G. **Avaliação da atividade antioxidante e quantificação dos principais constituintes bioativos de algumas variedades de frutas cítricas** (Tese de Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho. São Paulo, 2009.
- ESSÉN, B.; KAIJSER, L. Regulation of glycolysis in intermittent exercise in man. **Journal of Physiology**. London, v. 281, p. 499-511, 1978.
- ESTADELLA, D.; NASCIMENTO, C. M. P. O.; OYAMA, L. M.; RIBEIRO, E. B.; DÂMASO, A. R.; PIANO, A. Lipotoxicity: Effects of Dietary Saturated and Transfatty Acids. **Mediators of Inflammation**. v. 2013, p. 1-1, 2013. doi:10.1155/2013/137579
- FERREIRA, A.L.A. , Matsubara L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.**Rev. Assoc. Med. Bras**. vol.43 n.1 São Paulo, 1997.
- FINUCANE, M.M.; STEVENS, G.A.; COWAN, M.J.; DANAEI, G.; LIN, J.K.; PACIOREK, C.J.; SINGH, G.M.; GUTIERREZ, H.R.; LU, Y.; BAHALIM, A.N.; FARZADFAR, F.; RILEY, L.M.; EZZATI, M.; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9•1 million participants. **The Lancet** v. 377, p. 557-567. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62037-5.
- FOX , S. **Human Fysiology**. 9th ed. New York: Mcgraw-Hill Companies, 2006.
- GIBALA, M.J; LITTLE, J.P,; MACDONALD, M.J; HAWLEY, J.A. **Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease**. *The Journal of Physiology*. 2012;590(Pt 5):1077-1084. doi:10.1113/jphysiol.2011.224725.

GOES, A. T. R. **Efeito Terapêutico do Exercício Aeróbico em um Modelo da Doença de Parkinson Induzida por 6- Hidroxidopamina em Camundongos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pampa. Itaqui, 2013.

GÓMEZ-CABELLO, A. et. al. Sitting time increases the overweight and obesity risk independently of walking time in elderly people from Spain. **Maturitas**, 73(4), p. 337–343, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.maturitas.2012.09.001>

GUARATINI, T.; MEDEIROS M. H. G; COLEPICOLO P. **Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia.** Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo - SP, Brasil, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine.**Oxford: Clarendon Press, 543 p., 1989.

HARMAN, D. The Free Radical Theory of Aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 5, 2003.

HILLIER-BROWN, F. C., BAMBRA, C. L., CAIRNS, J.-M., KASIM, A., MOORE, H. J.; SUMMERBELL, C. D. A systematic review of the effectiveness of individual, community and societal-level interventions at reducing socio-economic inequalities in obesity among adults. **International Journal of Obesity**, v. 38(12), p.1483–1490, 2014.

HOLLOSZY, J. Muscle metabolism during exercise. **Archives of Physical and Rehabilitation Medicine**. v.63 p.231-241, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional de Saúde: Percepção do estado de Saúde, estilos de vida e doenças crônicas.** Rio de Janeiro, 2013.

INTERNATIONAL FOOD POLICY RESEARCH INSTITUTE (IFPRI).. **Da promessa ao impacto: Erradicando a Malnutrição até 2030. Global Nutrition report**, 2016.

JONG, C.J.; ITO, T; MOZAFFARI, M; AZUMA, J.; SCHAFFER, S. Effect of beta-alanine treatment on mitochondrial taurine level and 5-taurinomethyluridine content. *J Biomed Sci.* 2010 Aug 24;17 Suppl 1:S25. doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S25.

KAUR P, REIS MD, COUCHMAN GR, FORJUOH SN, GREENE JF Jr, et al. (2010) SERPINE 1 Links Obesity and Diabetes: A Pilot Study. *J Proteomics Bioinform* 3: 191-199. doi:10.4172/jpb.1000139

KOHLMANN, G. R. Hipertensão arterial no paciente obeso. **Rev Bras Hipertensão**, v.9, p. 262-267, 2002.

LEVINE R. L.; WILLIAMS J. A.; STADTMAN E. R.; SHACTER E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol** n. 233 p.346-357, 1994.

LOWRY O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement.** 1951

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. **Folin-Phenol reagents.** J Biol Chem 193:265-275, 1951.

LUZ, C. R. da. **Efeitos da suplementação de leucina e aminoácidos de cadeia ramificada associados ao exercício de força sobre a via de sinalização Akt/mTOR: um estudo randomizado, duplo-cego e controlado por placebo.** 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP P.V.; Clark D.P. **Microbiologia de Brock** 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MALCOLM, J.J.; VASILAKI, A.; MCARDLE, A. **Cellular mechanisms underlying oxidative stress in human exercise.** Original Research Article- Free Radical Biology and Medicine, Volume 98, September 2016, Pages 13-17.

MALLOY-DINIZ, L. F.; FUENTES, D.; COSENZA, R. M. **Neuropsicologia do Envelhecimento: Uma Abordagem Multidimensional.** Porto Alegre. Artmed, 2013.

MANCINI, M.C., GELONEZE, B, SALLES, J.E.N, LIMA, J.G., CARRA, M.K. **Obesidade e Doenças Associadas.** Tratado de Obesidade. Itapevi: AC Farmacêutica. 2010; 253--264.

MARKLUND, S. **Pyrogallol autooxidation.** Handbook of Methods for Oxygen Radical, 1985.

MAYER, B. **Nitric oxide.** Springer. Department of pharmacology and toxicology, Austria, 2000.

MELO, E. A. **Guia alimentar para a população brasileira.** Ministério da Saúde. 2ª ed. Brasília-DF, 2014

MURADÁS, R. **Efeitos do Exercício Físico Aeróbico e Resistido nos Níveis de Interleucina-6 em Hipertensos.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. Santa Cruz do Sul, 2012.

NAUDI, A.; JOVE, M.; AYALA, V.; CASSANYE, A; SERRANO, J.; GONZALO, H.; BOADA, J.; PRAT, J.; PORTERO-OTIN, M.; PAMPLONA, R. **Cellular Dysfunction in Diabetes as Maladaptive Response to Mitochondrial Oxidative Stress.** Experimental Diabetes Research. V. 2012, p. 1-14, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/696215>

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica- Lehninger.** . 4ª ed., 2008.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.** Free Radical Biology and Medicine, v. 31, p.1287–1312 2001.

OHKAWA H, OHISHI N, AND YAGI K. Thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358. 1981.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by. 1979.

OMS. Relatórios Mundiais da Saúde, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>. Acesso em: 15/ 08/2015.

OWEN, N.; HEALY, G. N.; MATTHEWS, C. E.; DUNSTAN, D. W. Too much sitting: the population health science of sedentary behavior. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 38(3), p. 105–113, 2010. <http://doi.org/10.1097/JES.0b013e3181e373a2>

PACK, Allan I. Obstructive sleep apnea. *Advances in Internal Medicine*, v. 39, p. 517-567, 1994.

PAPADAKIS, M. A.; McPHEE, S. J., RABOW, M. W. *Current Medical Diagnosis Treatment - 53ª ed.* Department of medicine university of California, San Francisco. Mc Graw Hill Education, 2015.

PIMENTA, M.; BRINGHENTII, S.; MELLO, V. S.; MENDES, I. K. dos S., AGUILA M. B., LACERDA, C. A. M. DE-. High-intensity interval training beneficial effects on body mass, blood pressure, and oxidative stress in diet-induced obesity in ovariectomized mice. *Life Sciences*, Oct 15, 2015, Vol.139, p.75(8).

PINHO R A, SILVA L A, PINHO C A, ET AL. Oxidative stress and inflammatory parameters after an Ironman race. *Clin J Sport Med*. 2010. 20:306-311.

POIRIER P.; GILES T. D.; BRAY G. A.; HONG Y.; STERN, J.S.; PI-SUNYER, F.X.; ECKEL, R.H. American Heart Association; Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. v. 113(6), p.898-918, 2006.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. *Fisiologia do Exercício - Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho*. 6ª ed. Manole, 2009.

POWERS, S. K; HOWLEY, E. T. *Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho*. 3 ed. São Paulo: Manole, 2000.

PROENÇA, R. P.C. Alimentação e globalização: algumas reflexões. *Ciência e Cultura*, vol.62, n. 4. São Paulo, 2010.

REIS, V. M. Gasto energético, custo energético aeróbio e custo energético anaeróbico. *Rev. Bras. Cineantropom Desempenho Hum*, v. 13(6), p. 485-486, 2011.

Research Greenwald, Press boca raton: p. 243-247. 1951.

RUSSEL, J. B. Química Geral, v.1, 2ª ed.. Pearson Makron Books. São Paulo: 1994.

SAHA, P.; BANERJEE, P.; AUDDYA, L.; PAL, P.; DAS, M.; DUTTA, M.; SEM, S.; MONDAL, M. C.; KUMAR, A.; BISWAS, U. K. Simple Modified Colorimetric Methods for Assay of Total Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plasma: Study in Diabetic Patients. Archives of Medicine. V. 7, n. 5, p. 1-7, 2015.

SAIEDULLAH M (2016) Insulin Sensitivity or Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus with Obesity. Diabetes Case Rep 1:e102.

SALMON, J.; OWEN, N.; CRAWFORD, D.; BAUMAN, A.; SALLIS, J. F. Physical activity and sedentary behavior: a population-based study of barriers, enjoyment, and preference. Health Psychology. Official Journal of the Division of Health Psychology, American Psychological Association. v. 22(2), p. 178–188, 2003. <http://doi.org/10.1037/0278-6133.22.2.178>

SASSI, F. Obesity and the economics of prevention: fit not fat. OECD, p.24-44, 2010.

SCHAFFER, S.W.; AZUMA, J.; MOZAFFARI, M. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. Can J Physiol Pharmacol. 2009 Feb;87(2):91-9. doi: 10.1139/Y08-110.

SCHNEIDER, C. D. et al. Efeito do exercício de ultrarresistência sobre parâmetros de estresse oxidativo. Rev Bras Med Esporte. vol.15, n.2, p. 89-92, 2009.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. Química Nova, v. 34(2), p. 300-305, 2011.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semina: Ciências Agrárias v. 31, n. 3, 2010.

Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care. American Diabetes Association 2011 .doi: 10.2337/dc11-S011.

TJONNA, A. E.; LEE, S. J.; ROGNMO O.; STOLEN, T. O.; BYE, A.; HARAM, P. M.; LOENNECHEN, P. J.; AL-SHARE, Q. Y.; SKOGVOLL, E.; SLØRDAHL, S. A.; KEMI, O. J.; NAJJAR, S.M.; WISLOFF, U. Aerobic Interval Training Versus Continuous Moderate Exercise as a Treatment for the Metabolic Syndrome- A Pilot Study. EXERCISE PHYSIOLOGY, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.772822> Originally published July 21, 2008.

VILLANUEVA, T.; JUAN, E.; CONDEZO, H.; LUIS, A. and ASQUIERI, RAMIREZ, E. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). Ciênc. Tecnol. Alimentos., vol.30, suppl.1, p.151-160. ISSN 0101-2061, Mayo 2010.

WEINECK, J. Manual de Treinamento Esportivo. 2ª ed. São Paulo: Manole, 1989.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose

tissue. Journal of Clinical Investigation. 2003;112(12):1785-1788.
doi:10.1172/JCI200320514.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. Methods Enzymol. v.77 p.325-333, 1981.

WILMORE, J. H.; COSTIL, D. L. Fisiologia do esporte e do exercício.726p. São Paulo: Manole, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Noncommunicable diseases Country Profiles. Geneva: World Health Organization, 2011.

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: **ARIENE SAMPAIO SOUZA FARIAS ULBRICHT**

RG: 4.120.030 - SSPSC

Título da Dissertação: **EFEITOS DE DOIS PROTOCOLOS DE TREINAMENTO AERÓBICO SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS OBESOS**

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 27 de janeiro de 2017.



ARIENE SAMPAIO SOUZA FARIAS ULBRICHT