KATHERINE MARIA DE ARAÚJO VERAS

**TREINAMENTO AERÓBIO DE INTENSIDADE
MODERADA MANTÉM A VIABILIDADE CELULAR DE
ILHOTAS PANCREÁTICAS E PREVINE A PERDA DA
RESPOSTA SECRETORA DE INSULINA À GLICOSE EM
CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERCALÓRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

KATHERINE MARIA DE ARAÚJO VERAS

**TREINAMENTO AERÓBIO DE INTENSIDADE
MODERADA MANTÉM A VIABILIDADE CELULAR DE
ILHOTAS PANCREÁTICAS E PREVINE A PERDA DA
RESPOSTA SECRETORA DE INSULINA À GLICOSE EM
CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERCALÓRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Veras, Katherine Maria de Araújo.

Treinamento aeróbio de intensidade moderada mantém a viabilidade celular de ilhotas pancreáticas e previne a perda da resposta secretora de insulina à glicose em camundongos alimentados com dieta hipercalórica / Katherine Maria de Araújo Veras. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Investigação da regulação da transmissão do sinal da insulina em seus tecidos-alvo/ Investigação da regulação da transmissão do sinal intracelular de hormônios peptícos/ Investigação do “cross-talk” entre vias de sinalização de diferentes hormônios.

Versão do título para o inglês: Moderate aerobic training maintains pancreatic islet cellular viability and prevents glucose stimulated insulin secretion impairment in mice fed a hypercaloric diet

1. Fisiologia endócrina 2. Secreção de insulina 3. Ilhota pancreática
4. Dieta hipercalórica 5. Treinamento físico 6. Prevenção I. Carvalho, Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0116/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Katherine Maria de Araújo Veras.

Título da Tese: Treinamento aeróbio de intensidade moderada mantém a viabilidade celular de ilhotas pancreáticas e previne a perda da resposta secretora de insulina à glicose em camundongos alimentados com dieta hipercalórica.

Orientador(a): Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Carvalho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 65 nas fls. 07 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Carala Roberta de Oliveira Carvalho**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos do treinamento aeróbio e da dieta hiperlipídica e sacarose sobre a secreção de insulina, estresse oxidativo e respostas inflamatórias em ilhotas pancreáticas de camundongos C57BL/6*" do qual participam o(s) aluno(s) **Katherine Maria de Araújo Veras** e o pesquisador **Angelo Rafael Carpinelli**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **20.06.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 24 de junho de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedicatória

Aos meus pais, Petrócio e Dolores, e ao meu irmão, Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Relembrando um pouco do contexto o qual me fez chegar até aqui.

Obrigada à Universidade Federal de Alagoas, às queridas professoras Terezinha e Suzana, que me deram a oportunidade de iniciar a construção de um longo, viciante e encantador caminho, à começar pela iniciação científica.

Muito obrigada, São Paulo, por me acolher desde 2008.

Universidade de São Paulo, é uma honra ter construído parte do meu conhecimento, aqui.

Muito obrigada à querida orientadora, professora Carla Roberta de Oliveira Carvalho, por ter me aceitado como aluna em seu laboratório há 7 anos, sem ao menos me conhecer pessoalmente. Obrigada pela paciência e pela relação de orientação mais democrática que já conheci.

Teca, tequinha, Luciene Ribeiro, pela ajuda com a adaptação à nova vida em São Paulo.

Aos colegas de laboratório, muito obrigada. Maluzinha e sua boa vontade em ajudar, obrigada também pelos biscoito de polvilho.

Obrigada aos professores do departamento de Fisiologia e Biofísica, principalmente o professor Ângelo Carpinelli e seu grupo de “ilhoteiros”: Camila (“minha mãe”), Elozinha, Gabi, Aninha, Maíra, Fêr, professor Fernando Abdulkader e à todos do seu laboratório.

Aline David e Sandra Rodrigues, pela atenção e carinho ao longos desses anos de estudo na pós-graduação, obrigada.

Juan, obrigada pelo carinho e contribuição crítica que tivestes com a minha tese.

Professor Rui Curi, sempre muito atencioso e prestativo, e à todos do seu laboratório.

Professor Marcelo Muscará, da farmacologia, e a excepcional Simone, pela perseverante ajuda com as “filhotas”.

Aos colegas e funcionários do biotério, da biblioteca, da limpeza, portaria e à todos que formam a família ICB. Zé e Paloma, pela paciência infinita e por solucionar nossos problemas burocráticos.

Obrigada à EACH, USP leste, mais precisamente à professora Fabiana Evangelista e suas alunas Cynthia, Vanessa e Ana. Obrigada por compartilhar o laboratório de vocês comigo.

Ao professor Markus Tiedge e seu pequeno e “super” eficiente grupo de pesquisa em Rostock, por ter me recebido para estágio no primeiro ano do doutorado.

Obrigada à UCT, ao ESSM e, mais precisamente, à querida Julia Goedecke, que não só me aceitou, do ponto de vista formal, mas também me incorporou ao seu grupo de pesquisa durante o estágio de doutorado sanduiche.

Meus amigos de Maceió, minhas amigas-irmãs, ainda é muito difícil estar longe do carinho de vocês.

Aos meus queridos padrinhos, sempre presentes.

Aos meus pais e ao Rodrigo, pelo amor infinito.

Ao professor e companheiro Flávio Pires, obrigada por todo o amor e pela tamanha compreensão ao longo desses 5 anos de parceria. Você me inspira. Adoro fazer parte das discussões do “bar ciência”.

Obrigada aos animais “cedidos” pela natureza. Sem eles, seria difícil conseguir medir variáveis tão específicas.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro formal, bem como, ao apoio financeiro cedido pela Pró-Reitoria de Pós Graduação da USP, para estágio na Alemanha.

“Uma nova verdade científica não triunfa porque os que se opunham a ela veem a luz e saem convencidos, mas porque eles acabam morrendo e surge uma nova geração mais familiarizada com ela.”

Thomas Kuhn

RESUMO

VERAS, K. M. A. **Treinamento aeróbio de intensidade moderada mantém a viabilidade celular de ilhotas pancreáticas e previne a perda da resposta secretora de insulina à glicose em camundongos alimentados com dieta hipercalórica.** 2016. 99 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os efeitos do treinamento aeróbio moderado sobre a viabilidade celular e a GSIS das ilhotas pancreáticas foram investigados em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em lipídios (60%) e sacarose (20%) (HFDS). Os grupos foram: HFDS, dieta controle (C), HFDS treinado (HFDSTR), controle treinado (CTR). Após 8 semanas, houve aumentada massa corporal e adiposidade e diminuída tolerância à glicose e sensibilidade à insulina no HFDS; tais efeitos foram atenuados em HFDSTR. Houve menor percentual de células viáveis e prejudicada GSIS no HFDS do que no HFDSTR e C. As expressões do GLUT2 e da CuZn superóxido dismutase-1 (SOD1) foram diminuídas em HFDS, mas não no HFDSTR. As respostas observadas nas ilhotas do grupo HFDSTR foram semelhantes ao grupo C. O treinamento aeróbio de 8 semanas preveniu os efeitos deletérios da HFDS sobre a sensibilidade à insulina, viabilidade celular e GSIS e manteve o conteúdo enzimático antioxidante endógeno, sugerindo que o treinamento aeróbio possa ser benéfico na prevenção dos efeitos deletérios de uma HFDS.

Palavras-chave: Dieta rica em lipídio e sacarose. treinamento aeróbio. ilhotas pancreáticas. GSIS. viabilidade celular. Prevenção. SOD1 e GLUT2.

ABSTRACT

VERAS, K. M. A. **Moderate aerobic training maintains pancreatic islet cellular viability and prevents glucose stimulated insulin secretion impairment in mice fed a hypercaloric diet.** 2016. 99 p. Ph. D. thesis (Human Physiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

This study investigated the aerobic training effects on GSIS and pancreatic islet cellular viability in C57BL/6 mice fed a high fat (60%) and sucrose (20%) diet (HFDS). The groups were: HFDS, control diet (C), HFDS + training (HFDSTR) and control trained (CTR). After 8 weeks the HFDS significantly increased body mass and adiposity, decreased glucose tolerance and insulin sensitivity, and impaired GSIS and cellular viability; these effects were attenuated in HFDSTR. There were less viable pancreatic islets cells and impaired GSIS in HFDS than in HFDSTR and C. The decreased GLUT 2 and CuZn-superoxide dismutase 1 (SOD1) protein expression in HFDS were increased in HFDSTR. Most pancreatic islet responses were similar between HFDSTR and C. Eight weeks aerobic training prevented deleterious effects of HFDS on insulin sensitivity, cellular viability and GSIS, and maintained endogenous antioxidant enzyme content, thus suggesting that aerobic training may be beneficial to prevent adverse metabolic effects associated with westernized diet consuming.

Keywords: High fat diet and sucrose. aerobic training. pancreatic islet. GSIS. cellular viability. Prevention. SOD1 and GLUT2.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Modelo esquemático do desenho experimental do estudo.....32

Figura 2 – Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a evolução ponderal de camundongos C57Bl6. Painel A. é o slope da massa corporal (g) durante as 8 semanas de experimentação. Painel B. é o ganho de massa corporal dos grupos experimentais.....46

Figura 3 – Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a ingestão alimentar e consumo hídrico dos camundongos C57Bl6. Painel A. é a ingestão alimentar durante as 8 semanas de experimentação. Painel B. é a área sob a curva da ingestão alimentar (AUC) dos grupos experimentais. Painel C. é o consumo hídrico durante as 8 semanas de experimentação. Painel D. é o consumo hídrico (AUC) dos grupos experimentais.51

Figura 4 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre o consumo energético e o CEA dos camundongos C57Bl6. Painel A. é o consumo energético dos grupos experimentais. Painel B. é o CEA dos grupos experimentais.53

Figura 5 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a perda de peso e temperatura retal dos camundongos C57Bl6. Painel A. é a perda de peso induzida por jejum de 12 horas ao final da 8ª semana do protocolo experimental, nos grupos experimentais. n=8-9. Painel B. é a temperatura retal após jejum de 12 horas ao final da 8ª semana do protocolo experimental nos grupos experimentais.....54

Figura 6 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre o tempo de exaustão e a atividade da citrato sintase dos camundongos C57Bl6. Painel A é o tempo máximo até a exaustão no teste em esteira. Painel B. é a atividade da enzima citrato sintase no músculo gastrocnêmio nos grupos experimentais.56

Figura 7 - Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina nos grupos experimentais, ao final do período experimental. Painei A é o GTT (teste de tolerância oral à glicose realizado ao final da semana 8. Painei B. é o GTT (AUC) ao final do período experimental. Painei C é o Kitt ao final do período experimental.....58

Figura 8 - Concentração sérica de TBARS coletadas ao final do período experimental.

.....61

Figura 9 - Viabilidade celular em ilhotas pancreáticas ao final do período experimental. Painei A. é o percentual de células viáveis. Painei B. é o percentual de células em apoptose por citometria. Painei C é a fragmentação de DNA.62

Figura 10 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a GSIS dos camundongos C57Bl6. Painei A é a secreção de insulina estimulada por baixa (2,8 mM) e alta (16,7 mM) concentração de glicose das ilhotas pancreáticas após o período experimental. Painei B. é a diferença (delta) da GSIS entre as concentrações de 16,7 mM e 2,8 mM de glicose.....64

Figura 11 - Conteúdo de etídio avaliado pela intensidade média de fluorescência emitida pelo diidroetídio (DHE) em células dispersas de ilhotas isoladas, após 1 hora do estímulo em baixa (2,8 mM) e alta (16,7 mM) concentração de glicose, nos grupos experimentais.

.....65

Figura 12 - Atividade da arginase em ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais, coletadas ao final do período experimental.

..... 66

Figura 13 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a expressão de nitrotirosina dos camundongos C57Bl6. Painei A. é o Slot blot [expressão de nitrotirosina (NT) no extrato de proteína de ilhotas pancreáticas] após o período experimental nos grupos experimentais. Bandas coradas com ponceau foram utilizadas para normalizar o controle. NTBSA (albumina nitrada de soro bovino) e BSA e foram utilizadas como controle

positivo e negativo, respectivamente. n=3-5. Paineis A e B. são a expressão de NT.
.....67

Figura 14 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a expressão de SOD1, e-NOS, PDX1 e GLUT2 nas ilhotas pancreáticas dos camundongos C57Bl6. Paineis A, B, C, D e E. são a expressão proteica da SOD1, eNOS e PDX1 no extrato de proteína de ilhotas pancreáticas após o período experimental, nos grupos experimentais. Paineis A e B. são a expressão da SOD1. Paineis C e D. são a expressão da e-NOS. Paineis E e F. são a expressão proteica do GLUT2.....69

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Peso dos tecidos normalizados para o peso corporal total dos animais.....49

Tabela 2 – Avaliação sanguínea da insulina, glicose, TG totais, colesterol total, ALT, AST e razão AST/ALT e medidas de tolerância à glicose (GTT) e sensibilidade à insulina (índices HOMA) dos animais C, CTR, HFDS, HFDSTR.60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGS - Ácidos graxos saturados	HOMA- β - Modelo de avaliação da
C - Grupo Controle	Homeostase da função da célula β
°C - Graus Celsius	pancreática
CEA - Coeficiente de eficiência	HOMA IR - Modelo de avaliação da
Alimentar	Homeostase de resistência à insulina
CTR - Grupo controle, treinado	Intraperitoneal - ip.
DAG - Diacilglicerol	KITT - Índice de decaimento da
DHE - Dihidroetidina	glicose
DM2 - Diabetes tipo 2	MAPK - Proteína Cinase Ativada por
DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-	Mitógeno
nitrobenzóico	NADH - Nicotinamida adenina
DTT – Ditiotreitól	dinucleotideo
FADH ₂ - Flavina adenina	NEFAs - Ácidos graxos não
dinucleotídeo	esterificados
GLUT2 - <i>Glucose transporter 2</i>	NrF2 <i>nuclear erythroid-2 like factor-2</i>
GPX1 – Glutathione Peroxidase	PKC - Proteína Cinase C
GSIS - <i>Glucose-stimulated insulin</i>	PLC - Fosfolipase C
<i>secretion</i>	PMSF - <i>Fluoreto de fenil metil sulfonila</i>
GTT - Teste de tolerância à glicose	RI - Resistência à insulina
HFDS - Grupo dieta rica em lipídio e	RIA - Radioimunoensaio
sacarose	RNS - Espécies reativas de nitrogênio
HFDSTR - Grupo dieta rica em lipídio e	ROS - <i>Reactive oxygen species</i>
sacarose, treinado	SFB - Soro fetal bovino

SOD1 - CuZn superóxido dismutase-1

TBS-t - *Tris buffered saline-tween*

TG - Triglicérides

ZDF - Ratos Zucker obesos e diabéticos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Considerações gerais.....	19
1.2 Glicose e secreção de insulina.....	19
1.3 Ácidos graxos e secreção de insulina.....	21
1.4 Obesidade e pâncreas endócrino.....	22
1.5 Espécies reativas.....	25
1.6 Treinamento físico.....	28
1.7 Justificativa.....	30
1.8 Hipótese.....	30
1.9 Objetivos.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1 Delineamento experimental: dieta e protocolo de exercício treinamento.....	31
2.2 Dados metabólicos.....	34
<i>2.2.1 Medidas de massa corpórea, ingestões alimentar e hídrica.....</i>	<i>34</i>
<i>2.2.2 Avaliação da eficiência alimentar.....</i>	<i>34</i>
<i>2.2.3 Eutanásia, extração dos tecidos e coleta de sangue.....</i>	<i>34</i>
2.3 Materiais.....	35
2.4 Teste de tolerância à insulina curto para obtenção do índice de decaimento da glicose (KITT) e teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ip.GTT).....	36
2.5 Ensaio da atividade da enzima citrato sintase muscular.....	37
2.6 Isolamento das ilhotas pancreáticas.....	37
2.7 Avaliação da viabilidade celular em ilhotas pancreáticas isoladas por citometria de fluxo.....	38
2.8 Avaliação da apoptose celular em ilhotas pancreáticas isoladas.....	39
2.9 Análise da secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas induzida por glicose (GIIS)	39
2.10 Determinação de insulina por RIE.....	40
2.11 Conteúdo de etídio.....	41

2.12 Immunoblotting típico para análise das proteínas intracelulares das ilhotas pancreáticas isoladas.....	41
2.13 Análise da expressão de resíduos protéicos de nitrotirosina (NT) por SLOT BLOT.....	43
2.14 Determinação da atividade da arginase em ilhotas pancreáticas isoladas.....	44
2.15 Análise estatística.....	44
3 RESULTADOS.....	46
3.1 Caracterização do modelo de obesidade induzida pela dieta HFDS.....	46
3.2 Variáveis envolvidas com o balanço energético.....	50
3.3 Exercício moderado e eficácia do treinamento.....	55
3.4 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (IPGTT) e à insulina curto (KITT)	57
3.5 Dosagens séricas.....	59
3.6 Viabilidade celular das ilhotas pancreáticas.....	61
3.7 Funcionalidade da célula: secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS)	63
3.8 Conteúdo de etídio em células dispersas de ilhotas isoladas.....	65
3.9 Atividade da arginase.....	65
3.10 Análise de proteínas contendo resíduos de nitrotirosina (3-NT)	66
3.11 Análise da expressão protéica da SOD1, eNOS, PDX1 e GLUT2 em ilhotas pancreáticas isoladas.....	67
4 DISCUSSÃO.....	70
5 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXOS.....	99
A – Figura 1 –Área sob a curva da massa corporal dos grupos experimentais.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O estilo de vida “ocidentalizado”, atualmente denominado *nicho* obesogênico (WELLS, 2011), é responsável pelo aumento da prevalência do sobrepeso, obesidade e suas comorbidades, como resistência à insulina (RI) e até mesmo o diabetes tipo 2 (DM2). Esse *nicho* obesogênico envolve alimentação inadequada e sedentarismo como fatores de risco para o desencadeamento das doenças não transmissíveis, como a obesidade e o DM2 *World Health Organization* 2014 – (WHO). Os dados epidemiológicos são alarmantes e demonstram crescimento da prevalência e da incidência das doenças não transmissíveis em todo o mundo. Em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos com idade igual ou superior à 18 anos estiveram acima do peso. Destes, mais de 600 milhões eram obesos (WHO, 2106). Segundo o órgão, o número de pessoas que vive com diabetes quase quadruplicou desde 1980 para 422 milhões de adultos, com a maioria vivendo em países em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde destaca a necessidade de reforçar, sobretudo, o papel da prevenção e o tratamento da doença (WHO, 2016).

1.2 Glicose e secreção de insulina

O processo de secreção de insulina é finamente regulado pelas células beta (β) pancreáticas em resposta ao aumento da glicemia, principalmente (JITRAPAKDEE et al., 2010). Portanto, a glicose é o principal secretagogo fisiológico de insulina. Por outro lado, há outros nutrientes que também atuam como secretagogos da insulina como: ácidos graxos não esterificados (NEFAs) e alguns aminoácidos, como a leucina (MACDONALD et al., 2005)

Assim, as células β pancreáticas, que expressam em abundância o transportador de glicose/frutose (GLUT2) (BELL et al., 1990; GONZÁLEZ et al., 2009; LETURQUE et al., 2009), são capazes de captar, de forma eficiente,

diferentes concentrações de glicose, devido ao seu elevado K_m e V_{max} (COLVILLE et al., 1993). Isso significa que tais células possibilitam um fluxo contínuo e não saturável, em concentrações fisiológicas de glicose, para o seu interior, mas também, que o transporte de glicose aumente rapidamente, conforme a glicemia se eleve. Portanto, o resultado é a tendência de uma concentração intracelular de glicose em equilíbrio com a do meio extracelular, em particular o sangue (HABER et al., 2003).

Em linhas gerais, uma vez no citosol a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P) pela enzima glicoquinase sendo direcionada para o fluxo glicolítico (HABER et al., 2003; LAYCHOCK, 1990). O aumento do fluxo glicolítico induz à geração de metabólitos, como a nicotinamida adenina dinucleotídeo (*NADH*) e a flavina adenina dinucleotídeo (*FADH2*), que são subsequentemente oxidados na cadeia respiratória para permitir a produção de ATP. O aumento na razão ATP/ADP no citoplasma induz a redução da probabilidade de abertura do canal para potássio dependente de ATP, gerando uma oscilação no potencial da membrana plasmática da célula β , que se traduz como despolarização transitória da membrana, permitindo subsequentemente a abertura de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (tipo L). Como resultado, há influxo de Íons cálcio nas células, o que deflagrará o processo de exocitose dos grânulos de insulina e, portanto, a secreção de insulina induzida por glicose *glucose-stimulated insulin secretion* (GSIS) (AIZAWA et al., 1998).

Há também outra via intracelular ativada em resposta ao metabolismo da glicose nas células β , que envolve isoformas da fosfolipase C (PLC). Essa ativação promoverá a hidrólise de fosfolípidios da membrana e a geração de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) que, por sua vez, estimularão o efluxo de íons cálcio a partir do retículo endoplasmático para o citosol, aumentando, portanto, o Ca^{2+} citoplasmático além de diacilglicerol (DAG). O DAG é um potente ativador da proteína quinase C (PKC). O resultado final envolverá a fosforilação de proteínas, ativando-as e induzindo a exocitose dos grânulos de insulina (HABER et al., 2002).

Ademais, a glicose também pode modular o processo secretório de insulina por vias independentes da sua metabolização, despolarização da membrana e aumento do Ca^{+2} intracelular. As vias sugeridas para a ação “*beyond ionic events*”, são aquelas envolvidas com a ativação de PKC e da adenilato ciclase (AIZAWA et al., 1998). Dessa forma, uma vez que a proteína quinase C (PKC) e a adenilato ciclase estejam aumentadas no citoplasma das células β pancreáticas, a GSIS será aumentada, mesmo quando em baixas concentrações de Íons cálcio intracelular (KOMATSU et al., 1995; STRAUB et al., 1998)

1.3 Ácidos graxos e secreção de insulina

Os ácidos graxos são transportados na circulação na forma não esterificada, *non-esterified fatty acids* - (NEFAs), isto é, livres, complexados à albumina, ou na forma de triacilgliceróis, associados a lipoproteínas. Os mesmos se difundem através da membrana plasmática das células β pancreáticas, são convertidos à acil-CoAs de cadeia longa (LC-CoA) e transportados pela enzima localizada na parede membranosa mitocondrial chamada carnitina palmitoil transferase tipo I (CPT-I) para o interior das mitocôndrias, onde serão posteriormente submetidos à beta-oxidação (KUNAU et al., 1995). A oxidação dos ácidos graxos é minimizada ou inibida quando as concentrações de glicose estão elevadas: o malonil-CoA formado durante a oxidação da glicose inibe a CPT-I, bloqueando assim o transporte de LC-CoA para o interior da mitocôndria. O acúmulo de LC-CoA no citosol leva ao aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , bem como à mudanças no estado de acilação das proteínas envolvidas no processo de exocitose (DEENEY et al., 2000; ROTHMAN; ORCI, 1992;) amplificando portanto a GSIS (CARPINELLI et al., 2002; GRAVENA et al., 2002).

O potencial secretagogo dos ácidos graxos para a GSIS aumenta de acordo com o comprimento da cadeia dos ácidos graxos e diminui com o grau de insaturação dos mesmos (apud (GRACIANO et al., 2011). No entanto, há

vasta literatura demonstrando que o tempo de exposição das ilhotas pancreáticas aos diferentes tipos de ácidos graxos induz respostas heterogêneas quanto à GSIS (CARPINELLI et al., 2002; DHAYAL et al., 2008; PICINATO et al., 1998). A exposição à ácidos graxos saturados, como o palmitato, realizada de forma aguda, leva ao aumento na GSIS (CARPINELLI et al., 2002). Por outro lado, a exposição crônica e em altas concentrações à essas mesmas moléculas, situação bastante comum em indivíduos com síndrome metabólica (SABIN et al., 2007), resulta em defeito na secreção de insulina, além de poder comprometer a viabilidade das células β , com redução na biossíntese da insulina (OPARA et al., 1994; PLÖTZ et al., 2016; STEIN et al., 1997).

No entanto, em condição fisiológica como o jejum, a resposta adequada da GSIS é dependente das concentrações circulantes de NEFAs (STEIN et al., 1996). De fato, experimentos utilizando animais sob restrição alimentar demonstraram a importante relação entre glicose e ácidos graxos para a homeostase da célula β , indicando que desequilíbrios entre esses dois nutrientes possam contribuir para aparecimento ou progressão de condições patológicas como obesidade, resistência à insulina (RI), etc (NOLAN et al., 2006).

1.4 Obesidade e pâncreas endócrino

A qualidade e a quantidade tanto dos lipídios ingeridos, particularmente os ácidos graxos *trans* e os saturados (AGS), como o tipo de carboidratos ingeridos, isto é, os simples, como a sacarose, que são rapidamente absorvíveis, têm um importante papel na gênese da obesidade e suas complicações metabólicas, como a RI e Diabetes tipo 2 (DM2) (HU et al., 2001; MALIK et al., 2010). Nesse sentido, alguns dos AGS mais comuns encontrados na alimentação ocidental são os ácidos graxos palmítico (C 16:0) e esteárico (C 18:0), presentes principalmente em carne vermelha e na gordura de origem animal, denominada banha.

Com a obesidade, o efeito tampão do tecido adiposo pode ser excedido e o resultado envolve o acúmulo ectópico de gordura. Com isso, o excesso daqueles nutrientes pode ser armazenado na forma de triglicérides (TG) nos tecidos hepático, muscular estriado e pancreático.

O acúmulo ectópico de TG e seus metabólitos no citoplasma dessas células, pode modular diversas vias intracelulares relacionadas à respostas inflamatórias, danos celulares e até mesmo apoptose (ROBERTSON et al., 1992). O resultado envolverá prejuízo na captação e oxidação da glicose por esses tecidos e até morte celular. Esse evento é caracterizado como “lipotoxicidade”. Há evidências indicando que indivíduos obesos têm maior probabilidade de apresentar níveis elevados de NEFAs, devido à massa de tecido adiposo ser mais expandida e lipoliticamente ativa (AL-GOBLAN et al., 2014). A resistência à insulina, associada à obesidade, aumenta ainda mais os níveis de NEFAs, devido à redução da ação antilipolítica do hormônio (HUSSAIN, 2010; KAHN et al., 2006; KARPE et al., 2011).

Especificamente, dentre as consequências sistêmicas das altas e persistentes concentrações de NEFAs e glicose circulantes, fenômeno denominado glicolipotoxicidade, destacam-se aquelas sobre o pâncreas endócrino. Perda de função e massa de célula β são as sequelas da exposição crônica (JORDY et al., 2015; VELUTHAKAL et al., 2005). Na investigação dos eventos relacionados à glicolipotoxicidade, há mecanismos propostos para serem responsáveis pela desencadeamento da RI relacionada à obesidade, incluindo o acúmulo ectópico de lipídios e seus metabólitos atuando sobre vias envolvidas com inflamação, a disfunção mitocondrial, e/ou o estresse oxidativo. Nesse sentido, estudos em modelo animal são uma das alternativas utilizadas, dada a baixa viabilidade de estudos mais invasivos em seres humanos.

Por exemplo, camundongos de ambos os sexos, alimentados com dieta rica em gordura saturada, tornaram-se resistentes à insulina, apresentaram hiperinsulinemia e uma resposta secretora de insulina semelhante ao padrão humano de DM2 (CAPITO et al., 1992). Nessa perspectiva, células β pancreáticas de indivíduos ou animais obesos, não diabéticos, podem

apresentar tal resposta secretória, no sentido de “ajustar” as concentrações de insulina à alta demanda, para então, manter a normoglicemia. No entanto, quadro prolongado de RI pode desencadear uma redução na proliferação das células β pancreáticas, o que culminará com a falha na função das mesmas. Assim, RI é o primeiro passo para o desenvolvimento do DM2 (KAHN et al., 2014).

A etiologia do DM2 é multifatorial e envolve uma complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e epigenéticos. RI e secreção insuficiente desse hormônio são as principais características do DM2. Indivíduos com RI não desenvolvem DM2 enquanto a capacidade secretória de insulina estiver aumentada e, portanto, suficiente para manter a homeostase da glicose. Uma elevação modesta e temporária da secreção de insulina está atrelada à expansão das células β pancreáticas (DAI et al., 2013). Ao lado do seu papel sobre o desenvolvimento embrionário do pâncreas endócrino, o fator de transcrição *pancreatic duodenal homeobox 1* - (*PDX1*), é necessário para o processo de sobrevivência e hipertrofia celular compensatória consequente à RI. (SACHDEVA et al., 2009).

Foi verificado que as células β pancreáticas de ratos recém-desmamados e alimentados com dieta rica em gordura, por apenas uma semana após o desmame, apresentaram hipotrofia e hipoplasia. Isso contribuiu para a reduzida massa dessas células, bem como para a reduzida capacidade em sintetizar e secretar insulina e, como consequência, resultou em hipoinsulinemia (CERF, 2007)

Outro dado interessante, envolve a reduzida expressão do transportador de glicose tipo 2 (GLUT2) em ratos *Zucker* (ORCI et al., 1990). Esse é um modelo de obesidade em que a hiperplasia inicial foi seguida por uma redução para, aproximadamente, a metade das células beta e instalação de diabetes semelhante ao DM2. Ademais, o aumento de apoptose, detectado nas células β pancreáticas desses animais, foi relacionado ao maior conteúdo de TG e formação de ceramidas intracelular. Esses eventos precederiam a ativação da

sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) e consequente produção aumentada de óxido nítrico (SHIMABUKURO et al., 1998).

Parte dos mecanismos moleculares envolvidos com a modulação dos AGS e seus efeitos de lipotoxicidade sobre a funcionalidade das células β pancreáticas ainda permanece incompleta. Um dos mecanismos envolve o efeito dos AGS sobre a produção de *Reactive oxygen species* – (ROS), estresse oxidativo, com eventual disfunção e dano celular, e até mesmo aumento na morte da célula β (MORGAN et al., 2009).

1.5 Espécies reativas

Espécies reativas de oxigênio ou ROS, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são, em sua maioria, moléculas produzidas pelo metabolismo respiratório das mitocôndrias (complexos I e III da cadeia respiratória) a partir do metabolismo dos nutrientes (ACHARYA; GHASKADBI, 2010; GEHRMANN et al., 2010). Adicionalmente, existem outras fontes celulares de ROS, como o complexo enzimático xantina oxidase; lipoxigenases; cilcoxigenases; citocromo oxidase e o complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidase (NADPH-oxidase) importante gerador de ROS (PITHON-CURI et al., 2002).

Tanto as mitocôndrias como o complexo NADPH oxidase são importantes fontes de ROS (LELOUP et al., 2009; MORGAN et al., 2009). Essa enzima é composta por três isoformas citosólicas (p47, p67 e p40) e duas subunidades de membrana (gp91 e p22). As subunidades gp91 e p22 são proteínas integrais de membrana e correspondem ao núcleo catalítico da enzima (BABIOR, 1999).

NADPH oxidase foi originalmente identificada em células fagocíticas do sistema imunológico, como os neutrófilos. Seu papel é produzir concentrações de ânions $O_2^{\cdot-}$ nos fagossomos para eliminação de possíveis patógenos (BABIOR, 1999; MORGAN et al., 2009; PITHON-CURI et al., 2002). No entanto, o complexo enzimático NADPH oxidase não está apenas restrito ao sistema imunológico. Tanto sua expressão quanto a atividade também foram

identificados em ilhotas pancreáticas, sugerindo um papel importante para o funcionamento das células β (OLIVEIRA et al., 2003). Além disso, essas moléculas também estão envolvidas em condições fisiopatológicas como diabetes tipo 1 e 2, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (NEWSHOLME et al., 2007; THANNICKAL e FANBURG, 2000).

ROS foram considerados, inicialmente, como subprodutos metabólicos indesejáveis e prejudiciais aos sistemas biológicos (FINKEL, 1998). No entanto, estudos posteriores acabaram demonstrando a sua importância como um elemento essencial às muitas respostas biológicas, inclusive para as ilhotas pancreáticas (FINKEL, 2003; PI, COLLINS, 2010; PI et al., 2010). Em geral, ROS atuam como segundos mensageiros sobre cascatas de sinalização intracelulares, regulando inúmeras respostas biológicas, como crescimento celular, expressão gênica, ativação de cinases específicas e a modulação de canais iônicos (FINKEL, 2003; PI; COLLINS, 2010; PI et al., 2010). Pequenas variações intracelulares de ROS podem modular muitos processos fisiológicos, incluindo regulações transcricionais dependentes de redox (ARRIGO, 1999; LIU et al., 2005), o transporte de íons (KOURIE, 1998), bem como a fosforilação de proteínas (FINKEL, 1998; RHEE et al., 2005).

No entanto, quando ROS são sintetizadas em concentrações elevadas e mantidas cronicamente, podem desencadear efeitos prejudiciais por oxidação maciça e irreversível dos seus alvos moleculares, isto é, lipídios, proteínas e DNA. O dano provocado por ROS é dependente da sua síntese, bem como, do *status* antioxidante das células, sendo que os tecidos apresentam diferenças na suscetibilidade aos danos citotóxicos (ACHARYA; GHASKADBI, 2010). Em comparação aos demais tecidos, as ilhotas pancreáticas apresentam reduzida expressão gênica e atividade das enzimas antioxidantes, o que as torna mais sensíveis à lesão por ROS (LENZEN et al., 1996; TIEDGE et al., 1997).

A atividade da enzima CuZn superóxido dismutase-1 (SOD1), é estimulada agudamente pela glicose. Esse mecanismo parece ser importante para evitar os efeitos tóxicos e pontuais relacionados aos períodos de exposição às altas concentrações de glicose pelas ilhotas pancreáticas que ocorrem no período

absortivo (OLIVEIRA et al., 1999). No entanto, a persistência de uma alta concentração de glicose plasmática durante um período de tempo prolongado pode induzir glicotoxicidade na célula β e, conseqüentemente, favorecerão os efeitos relacionados ao aparecimento ou progressão da obesidade, RI e, finalmente, do DM2 (LENZEN et al., 1996; TIEDGE et al., 1997).

Além da produção de ROS, peroxinitrito (ONOO^-) e óxido nítrico também estão envolvidos com o desencadeamento de muitas doenças crônicas, além do DM2. Assim como os ROS, as espécies reativas de nitrogênio (RNS) também podem oxidar e danificar o DNA. Estas vias são aquelas sensíveis ao estresse celular e incluem a ativação do fator nuclear kB , p38 MAPK, hexosaminas, e outras. Além disso, existem evidências de que o aumento da ativação destas mesmas vias em pacientes diabéticos tipo 2 se dá em decorrência de elevações nas concentrações de glicose e NEFAs que podem levar à RI, estímulo a apoptose e prejuízo sobre a secreção de insulina (EVANS et al., 2003; NEWSHOLME et al., 2012; TEJEDO et al., 1999).

Além disso, tem sido sugerido que a viabilidade e função das células β pancreáticas depende do equilíbrio entre ROS e RNS. Este equilíbrio parece ser mantido mesmo em condições de sobrecarga metabólica e em condições fisiológicas normais, desde que as células β recebam todos os aminoácidos necessários para a síntese da enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GSH). Nesse sentido, quando a disponibilidade de aminoácidos como a cisteína, arginina, glutamina e glicina é reduzida, a síntese de GSH diminui, resultando na redução da capacidade de proteção de células β e perda de integridade celular (NEWSHOLME et al., 2012). Há várias evidências demonstrando que durante o desenvolvimento de DM2 há reduzida disponibilidade de cisteína, arginina, glutamina e glicina nas células β pancreáticas (NEWSHOLME et al., 2012). Inúmeros estudos continuam a buscar novas estratégias para proteger e ou otimizar a função das células β em face da sobrecarga de nutrientes, permitindo assim a homeostase glicêmica.

1.6 Treinamento físico

Além do tratamento nutricional e farmacológico (quando necessário), o treinamento é uma alternativa terapêutica utilizada no combate ao excesso da adiposidade e da suas consequências metabólicas (THENT et al., 2013). A título de exemplo, um estudo de intervenção por 14 semanas de treinamento físico de base comunitária em indivíduos adultos obesos, metabolicamente anormais [portadores entre 2 e 4 componentes da síndrome metabólica (SM)], levou os mesmos ao fenótipo de obesidade metabolicamente saudável (regressão para 1 ou menos componentes da SM). O modelo de treinamento foi considerado eficaz como prevenção primária do risco e dano para doenças cardiovasculares (DALLECK et al., 2014).

Evidências consistentes alertam sobre o risco da inatividade física para indivíduos que possuem fatores de risco ou já são portadores de doenças crônicas, como obesidade e DM2. As recomendações são consensuais para a importância de se adotar uma rotina de treinamentos regulares, principalmente, do ponto de vista de saúde pública (RIEBE et al., 2015).

O ACSM – (*American College Sports and Medicine*) recomenda, para adultos, a prática de treinamento em intensidade cardiorrespiratória moderada, de no mínimo 5 vezes por semana, com duração ≥ 30 minutos, que corresponde a cerca de 150 minutos de exercícios físicos por semana (COLBERG et al., 2010; GARBER et al., 2011). Essa rotina de treinamento mantida durante o período de 3 anos foi eficiente para reduzir em 58% a incidência de DM2 em grupo de indivíduos com risco de desenvolver doença cardiovascular (ERIKSSON et al., 1999; LINGOHR et al., 2002).

O treinamento induz adaptações e benefícios sistêmicos, que por sua vez, podem influenciar a função e sobrevivência celulares, inclusive para as células β pancreáticas (ZOPPI et al., 2011). Ao lado da melhora na sensibilidade à insulina (GALBO et al., 1981; KORANYI et al., 1991), foi demonstrada uma menor GSIS, relacionada à ativação da via de sinalização da AMPK, através de interferência no trânsito dos grânulos de insulina (TSUBOI et al., 2003).

Ademais, aumentos no teor da proteína GLUT2 em ilhotas de ratos, também foram descritos quando comparados aos animais controle sedentários (CALEGARI et al., 2011). Além disso, o treinamento induziu melhora na GSIS e após estímulo com KCl em ratos hiperglicêmicos secundariamente a 70% de pancreatectomia (PARK et al., 2007).

Estudos utilizando ratos *Zucker* obesos, hiperinsulinêmicos e com diabetes (ZDF), demonstraram que a perda de compensação da massa de células β e os prejuízos sobre a GSIS estão relacionados ao desenvolvimento das características metabólicas que fazem desse roedor um modelo de DM2 (PICK et al., 1998). Nesse sentido, aumento da massa, bem como prevenção da disfunção das células β , são os principais achados do treinamento em experimentação com animais (KIRÁLY et al., 2008), uma vez que o mesmo promove redução nas concentrações séricas de glicose e de ácidos graxos livres, portanto menos efeitos tóxicos às células β (LAMONTAGNE et al., 2007; VIOLLET et al., 2009).

A prática regular de exercício físico também pode modular a expressão e atividade de enzimas antioxidantes, bem como a produção de ROS. Uma superprodução de ROS ou uma falha nas defesas intracelulares que controlam o excesso dessas moléculas também estão envolvidas na patogênese de complicações metabólicas como a RI e DM2 (LELOUP et al., 2009; NEWSHOLME et al., 2007). Tais efeitos podem aumentar, diminuir ou serem inalterados em relação ao protocolo de exercício adotado (FERRARA et al., 2008). Dentro desse contexto, o treinamento físico pode ser utilizado como ferramenta tanto para tratar (VIEIRA et al., 2009) como para prevenir (JORDY et al., 2015) danos metabólicos induzidos pela obesidade.

1.7 Justificativa

O número de indivíduos obesos e diabéticos tem aumentado devido às mudanças no estilo de vida que favorecem ao sedentarismo e hábitos alimentares pouco saudáveis. O exercício aeróbio crônico melhora a sensibilidade à insulina, assim como modula a GSIS e produção de espécies reativas pelas ilhotas pancreáticas. Entretanto, a maioria dos achados foram obtidos a partir de estudos cujos modelos envolvem um caráter de tratamento, ou seja, efeitos que foram avaliados após a instalação do dano metabólico. Ao mesmo tempo, pouco é conhecido à respeito das bases moleculares que envolvem os efeitos preventivos do treinamento aeróbio sobre a viabilidade e função celular, influenciadas ou não pela produção de espécies reativas em ilhotas pancreáticas.

1.8 Hipótese

O exercício aeróbio crônico mantém a viabilidade celular, bem como a GSIS e produção de ROS pelas células β pancreáticas, quando aplicado simultaneamente à ingestão de uma dieta ocidentalizada, rica em gordura e sacarose, impedindo a instalação da obesidade e do DM2.

1.9 Objetivos

Verificar os efeitos do treinamento aeróbio realizado simultaneamente à HFDS, sobre a funcionalidade da célula β pancreática. Para tanto, foram avaliadas a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina; a viabilidade celular, a GSIS, bem como o conteúdo de ROS nas ilhotas pancreáticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), sob o número de protocolo 65 nas fls. 07 do livro 03, para uso de animais em experimentação. Ainda, todos os cuidados e manejo com esses animais foram conduzidos de acordo com os critérios apresentados durante o curso de biotério, para estudos com experimentação animal, oferecido pelo Departamento de Fisiologia e Biofísica.

2.1 Delineamento experimental: dieta e protocolo de exercício treinamento

Camundongos machos, C57BL/6, com 8 semanas de idade, foram randomizados em 4 diferentes grupos (dieta e/ou exercício) e aclimatizados no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/USP, em condições de ciclo claro-escuro 12 h /12 h e temperatura controlada (23 ± 2 °C). Água e comida foram administradas *ad libitum*.

O desenho experimental (Figura 1) do presente estudo, envolveu:

- 1) Animais alimentados com dieta controle, por 8 semanas, sedentários (grupo C);
- 2) Animais alimentados com dieta controle, treinados por 8 semanas (5 x por semana) com exercício aeróbio (grupo CTR);
- 3) Animais alimentados com dieta hipercalórica, rica em gordura e sacarose (20%) na água de beber (HFDS), por 8 semanas, sedentários (grupo HFDS), adaptada de (REEVES, 1997);
- 4) Animais alimentados com dieta hipercalórica, rica em gordura e sacarose (20%) na água de beber (HFDS), por 8 semanas, treinados (5 x por semana) com exercício aeróbio (grupo HFDSTR).

Figura 1 - Modelo esquemático do desenho experimental do estudo.

A dieta implementada foi a AIN-93M, controle e hiperlipídica (26% carboidratos, 59% de lipídios e 15% de proteína) + sacarose na água de beber, à 20% (açúcar refinado União, Brasil). Suas composições estão descritas no quadro 1, apresentado a seguir

Quadro 1 – Composição da dieta AIN-93M: Controle e Hiperlipídica

	Controle	Hiperlipídica
Carboidratos	70%	20%
Lipídios	10%	60%
Proteínas	20%	20%
Kcal/kg de dieta	3836	5231

FONTE: Adaptado de Reeves, 1997.

Na semana 0, todos os animais foram familiarizados ao exercício em esteira, sem quaisquer estímulo, tal como, choque elétrico ou empurrão, 10 minutos por dia, 4 vezes por semana. Nessa mesma semana, após os 4 dias da familiarização, os camundongos foram submetidos a um teste incremental máximo em esteira, adaptado de (FALONE et al., 2012). Resumidamente, esse protocolo consiste em aumentar a intensidade do exercício em 1metro/minuto até a exaustão. A exaustão foi determinada pela incapacidade de manter a velocidade de corrida sem permanente contato (4 segundos) com a divisória da esteira (HAUBOLD et al., 2003; LERMAN et al., 2002).

Em seguida, na semana 1, os animais dos grupos 2 e 4 realizaram treinamento aeróbio por 30 minutos com 60% da média da velocidade máxima atingida no primeiro teste de esforço (MOIEN-AFSHARI et al., 2008). Ao final da terceira semana, foi realizado o segundo teste incremental máximo, para ajuste das velocidades empregadas nas sessões de treinamento aeróbio dos animais dos grupos 2 e 4. Posteriormente, ao final da 8^a semana, conduziu-se o último teste incremental, para verificação dos efeitos do treinamento aeróbio e período de sedentarismo.

2.2 Dados metabólicos

2.2.1 Medidas de massa corpórea, ingestões alimentar e hídrica

Realizou-se o acompanhamento semanal da massa corporal dos animais. Ainda, foi quantificada a ingestão alimentar e hídrica por 24 horas durante o mesmo período. Para essas medidas, os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais onde cada animal recebeu um *pellet* pré-pesado da respectiva dieta, C ou HFDS e recipiente com volume (ml) definido de água para beber com ou sem sacarose. Após 24 horas, o sedimento e os seus restos foram pesados para determinar o consumo alimentar, bem como o volume residual de água na garrafa. Tais medidas foram expressas em kcal.

2.2.2 Avaliação da eficiência alimentar

Foi determinado o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) com o intuito de investigar como as diferentes composições das 2 dietas estudadas influenciaram a absorção de nutrientes e o gasto de energia, resultando no fenótipo da massa corporal adaptado de (LEVIN, 1986; TAGLE, 1981). Para efeito dos cálculos do CEA foram tomados os registros semanais do peso dos animais e da quota de dieta ingerida inclusive o volume de água contendo a sacarose, ao longo das 8 semanas de experimentação.

2.2.3 Eutanásia, extração dos tecidos e coleta de sangue

Ao longo da 9^a semana e, após 48 horas da última sessão de treino, os animais foram eutanasiados por decapitação precedida de narcose com mistura de gás carbônico e oxigênio na proporção de 70% e 30%, respectivamente (AVMA *Guidelines on Euthanasia*, 2007) para subsequente retirada dos tecidos alvo do estudo: tecido adiposo epididimal, músculo gastrocnêmio e ilhotas pancreáticas. Amostras de sangue também foram coletadas, separadas as

frações plasmáticas, acondicionadas em tubos tipo *ependorf* e armazenados em freezer -70 °C, para posteriores dosagens.

2.3 Materiais

Utilizou-se glicosímetro (*Accu-chek Active - Roche*), Contador tipo gama (*Perkin Elmer*, Finlândia) e citometria de fluxo *Guava EasyCyte (Millipore)*. A insulina regular foi fornecida pela *Eli Lilly and Company* (São Paulo, Brasil), já a insulina marcada com radioisótopo de iodo (^{125}I), foi da *Perkin Elmer* (Boston - MA - USA). Também foram utilizados os kits comerciais *Via Count (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos)*, bem como o *Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha)*.

Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), *Bradford*, *laemmli* e marcador de peso molecular pré-corado foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA, Estados Unidos). Leupeptina (*Transsonic T310, Camlab, Germany*). Fluoreto de sódio, ortovanadato de sódio, Metano hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PSMF), aprotinina, ditioneitol (DTT), albumina bovina sérica (BSA, fração V), colagenase tipo V- Triton X-100, glicerol, Tween 20 e polilisina foram fornecidos pela *Sigma Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose, ECL e os kits para detecção por quimioluminescência foram fornecidos pela *Amersham* (UK). D-glicose anidra e PEG (polietilenoglicol + tampão borato) foram fornecidos pela *Labsynth* (São Paulo, Brasil). Quanto aos anticorpos utilizados, Anti-SOD1, anti-GLUT2, anti-PDX1, anti-eNOS, foram fornecidos pela *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, CA) e o constitutivo, anti- α -Tubulina da *Invitrogen*, (Estados Unidos da América). O anticorpo anti-*rabbit* biotinilado foi obtido a partir da *Vector Laboratories* (*Burlingame, CA*) e o anti-*mouse* da *Invitrogen*. Além disso, foi utilizado o aparelho *Image Quant 350 (GE Healthcare, Oslo, Noruega)*, bem como o sistema *Chemilmager 5500 (Alpha Innotech Corporation, CA, EUA)* e o software

para quantificação das bandas, *ImageJ* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Estados Unidos).

Já o anticorpo anti-insulina (AC1), obtido a partir da imunização com insulina murina e padrões de insulina murina purificada, foram cedidos gentilmente pelo Dr. *Leclercq* da *Université Libre de Bruxelles*, Bélgica.

2.4 Teste de tolerância à insulina curto para obtenção do índice de decaimento da glicose (K_{ITT}) e teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ip.GTT)

Para a quantificação e análise das variáveis dependentes do estudo, como os testes de sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, os animais foram submetidos, ao final da 8ª semana de tratamento, ao repouso de 24 horas e restrição alimentar de 6 horas. Em seguida, administrou-se injeção ip., com solução de insulina em salina 0,9% (0,75 U/Kg de peso do animal), para o K_{ITT} , e solução de glicose em salina 0,9% (1 mg/g de peso corporal), para o GTT. A extremidade final da cauda do animal recebeu uma leve picada com auxílio de uma agulha para a obtenção de uma gota espessa de sangue, e nos tempos definidos a baixo, a cauda foi ordenhada para coleta de gotas subsequentemente. As glicemias foram determinadas utilizando-se glicosímetro.

Para a o K_{ITT} , amostras de sangue da cauda foram coletadas nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção da solução de insulina. A constante de decaimento da glicose foi calculada pela fórmula $0,693/t^{1/2}$, onde $t^{1/2}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear de decaimento da glicose plasmática (BONORA et al., 2000) O K_{ITT} foi apresentado como percentual de glicose desaparecida das amostras de sangue a cada minuto ($\%.\text{min}^{-1}$). Adicionalmente, fora utilizado o modelo de avaliação homeostática *HOMA*, do inglês *homeostatic model assesment*, método para avaliar a resistência à insulina (*HOMA IR*), bem como inferir sobre a função das células β (*HOMA β*), à partir da glicemia e insulina em jejum.

Para a determinação da curva glicêmica, a coleta de sangue foi realizada nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados da curva glicêmica foram representados pelo cálculo da área sob a curva (mg/dl/120min).

2.5 Ensaio da atividade da enzima citrato sintase muscular

Após 48 horas da última sessão de treino foi mensurada a atividade da enzima citrato sintase no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos sedentários (C e HFDS) e submetidos ao treinamento físico (C e HFDSTR), conforme descrito por (SRERE; BHADURI, 1964).

Resumidamente, foram utilizados o tampão de extração Tris-HCl 0,5 mM e EDTA 1,0 mM, pH 7,4, e o tampão para análise contendo Tris / aminometano (100 mM), ácido 5,5-ditiobis [2- nitrobenzóico] DTNB (0,2 mM), acetil-CoA (0,1 mM), e Triton X-100 (0,1% v/v), pH 8,1. A reação foi iniciada pela adição de 3µl do homogenato do respectivo músculo e 10 µl de ácido oxaloacético (concentração final 10 mM). A absorbância a 412 nm (25 °C) foi medida por espectrometria durante 5 minutos. A atividade foi mensurada a partir da quantificação do complexo formado entre a Coenzima A (CoA) liberada com o DTNB do meio e o oxaloacetato.

2.6 Isolamento das ilhotas pancreáticas

Os animais foram eutanasiados ao longo da 9^a semana, conforme os cuidados descritos anteriormente. Em seguida realizou-se a retirada do pâncreas, isolamento e análise das ilhotas pancreáticas: A retirada do pâncreas foi precedida de laparotomia ampla, exposição do ducto biliar comum, seu clampeamento pela extremidade distal junto ao duodeno e sua dissecação próxima ao pedículo hepático. Uma vez assim exposto, foi introduzida uma cânula de polietileno no ducto biliar e injetada anterogradamente cerca de 20 ml de solução de *Hanks* contendo colagenase tipo V (0,68 mg/ml) (protocolo proposto por (LACY; KOSTIANOVSKY, 1967) e modificado como descrito por

(CARPINELLI et al., 1992). A solução de *Hanks* foi composta em mM, por: NaCl 136, KCl 5,36, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,81, $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,3, KH_2PO_4 0,44, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,26, NaHCO_3 4,17, pH 7,4. Após divulsão do tecido acinar com tesoura de ponta romba, o pâncreas foi retirado e colocado em uma placa de Petri para dissecação de gânglios linfáticos, gorduras e vasos sanguíneos. O tecido foi colocado em tubo cônico tipo *falcon*, em banho-maria a 37 °C, durante 25 minutos, seguido por agitação manual no banho-maria, por mais 1 minuto, para a digestão da parte exócrina do pâncreas. Posteriormente foram feitas 3-4 lavagens do conteúdo do tubo, com ressuspensão do material isolado utilizando-se a solução de *Hanks*. A solução final foi depositada em placa de Petri para coleta das ilhotas com o emprego de micropipeta e lupa. De 100 a 200 ilhotas isoladas foram coletadas e lavadas com solução de *Hanks*.

2.7 Avaliação da viabilidade celular em ilhotas pancreáticas isoladas por citometria de fluxo

Cerca de 20 ilhotas de cada um dos 4 grupos de animais foram utilizadas para análise da viabilidade celular. Para tanto, as ilhotas foram submetidas à citometria de fluxo utilizando o kit *Via Count*. Esse kit comercial possui dois corantes que, com base na especificidade para permeabilidade de ligação ao DNA, permite identificar células viáveis, mortas e em processo de apoptose. Um desses corantes é anexina que liga-se à fosfatidilserina e encontra-se normalmente presente na face interna da membrana plasmática. Portanto, quando a membrana fica porosa, ocorre a externalização da fosfatidilserina e esta é detectada pela anexina. Adicionalmente, 20 ilhotas pancreáticas também foram coletadas e expostas à luz UV por 30 minutos para indução de apoptose, sendo denominadas de grupo controle positivo.

Após o período de incubação para aquelas controle positivas, as ilhotas de todos os grupos foram coletadas e mergulhadas em *eppendorfs* contendo 500 µL de meio RPMI com 11,1 mM glicose e Soro Fetal Bovino (10%). Em seguida foram centrifugadas em 1000 rpm, 10 °C por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e adicionados 500 µL de tripsina, por 2 minutos a 37 °C. A ação da

tripsina foi neutralizada com o acréscimo de 1 mL de meio RPMI + SFB, centrifugadas novamente em 1000 rpm, 10 °C por 3 minutos e, por fim, ressuspendidas em 200 µL de meio RPMI com SFB, homogeneizadas com pipeta (25 x). Em seguida, foram adicionados 150 µL do reagente *Via count* + 50 µL da suspensão da amostra por poço. As células foram mantidas por cinco minutos na ausência de luz, à temperatura ambiente. Após a incubação, a leitura da fluorescência das células em suspensão foi analisada por citometria de fluxo.

2.8 Avaliação da apoptose celular em ilhotas pancreáticas isoladas

A apoptose nas células das ilhotas pancreáticas isoladas foi avaliada como descrito por (NUNES et al., 2014) usando-se o comercial *kit Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* e seguindo-se as instruções do fabricante. O teste é baseado na medição quantitativa imunoenzimática de histona associada à fragmentos de nucleossomos (mono e oligonucleossomos). Amostras de 80 ilhotas foram lisadas em 100 µl do tampão de lise (proveniente do kit), e as frações, citosólicas e nucleares foram separadas por centrifugação. A média da absorbância de cada amostra foi normalizada pelo conteúdo de DNA na fração nuclear, usando um controle positivo, também fornecido pelo kit. Os resultados foram apresentados como percentual.

2.9 Análise da secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas induzida por glicose (GSIS)

Para avaliação da secreção estática de insulina, foram utilizados grupos de cinco ilhotas em triplicata para cada condição experimental. As ilhotas recém isoladas foram pré-incubadas por 30 minutos em 500 µl de *Krebs-Henseleit* (NaCl 115, NaHCO₃ 24, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, pH 7,4) em 5,6 mM glicose, suplementado com albumina bovina (0,2%). Em seguida, essas ilhotas foram lavadas e incubadas novamente em 2,8 e 16,7 mM de glicose, permanecendo em banho a 37 °C, por 60 minutos. Após esse período de incubação, foram removidos 450 µl do sobrenadante e estocados a -20 °C para posterior dosagem

de insulina, por radioimunoensaio (RIE). Em seguida, as ilhotas foram ressuspensas em 450 μ L de uma solução de álcool-ácido (52 mL etanol, 17 mL água, 1 mL ácido clorídrico), rapidamente sonicadas, proporcionando o rompimento das células, e estocadas à - 20 °C, para dosagem do conteúdo intracelular de insulina, também por RIE. Os dados foram expressos através da normalização da secreção pelo conteúdo de insulina e foram abordados como percentagem em relação ao controle.

2.10 Determinação de insulina por RIE

A insulina secretada pelas ilhotas pancreáticas, a correspondente ao estoque intracelular e a presente no plasma, foi determinada por RIE (MORGAN; LAZAROW, 1962). Para tanto, a solução reagente inclui uma quantidade conhecida de anticorpo, uma quantidade conhecida do hormônio marcado com radioisótopo de iodo (125 I) e uma quantidade desconhecida de hormônio não-radioativo (amostra). Como as duas formas de hormônio, radioativo e não-radioativo, competem por um mesmo número de locais de ligação ao anticorpo, quanto mais hormônio não-radioativo estiver presente, ou seja, a amostra, menos o hormônio radioativo irá se ligar. O complexo insulina-anticorpo marcado formado foi precipitado com PEG (PM 6000) e dosado em contador tipo gama. Uma curva padrão foi preparada, na qual a relação ligado/livre para o hormônio radioativo é plotada em função da concentração do hormônio não – radioativo e utilizada para determinar a concentração do hormônio em cada amostra. Os resultados finais foram apresentados como ng/dl, para a insulina plasmática e em $\text{ng secretado.ng conteúdo}^{-1}$, para a GSIS.

2.11 Conteúdo de etídio

A avaliação do conteúdo de etídio foi realizada utilizando o método de fluorescência com diidroetídio (DHE) (BINDOKAS et al., 2003). A hidroetidina (HE) ou DHE, é uma sonda redox-sensível, ainda bastante utilizada para detectar o conteúdo de etídio, cujos comprimentos de onda para análise são: excitação em 488 nm e emissão em 610 nm. A reação entre o superóxido produzido pelas células e o DHE citoplasmático resulta na formação de um produto oxidado e aumentada fluorescência. Para isso, grupos de 25 ilhotas pancreáticas isoladas foram incubadas e estimuladas com 2,8 e 16,7mM de glicose, como descrito no item 2.9. Em seguida, foi adicionada à solução de incubação, a DHE em concentração final de 50 μ M. As ilhotas ficaram na presença desse reagente por 20 minutos em temperatura ambiente sob agitação em *rocker*, no escuro. Passado esse período, a solução de incubação foi retirada e adicionados 500 μ L de tripsina por 2 minutos que, em seguida, permaneceram por 30 segundos sob agitação em banho Maria a 37 °C para a dispersão das células. A tripsina foi inativada com a adição de 1 mL de meio RPMI com 10% de SFB e os *ependorfs* foram centrifugados por 3 minutos a 1000 rpm em 10 °C. O sobrenadante foi retirado e as ilhotas foram homogeneizadas 20 vezes com pipeta em meio RPMI de forma a ressuspender as células dispersas. A fluorescência das células em suspensão também foi analisada por citometria de fluxo.

2.12 *Immunoblotting* típico para análise das proteínas intracelulares das ilhotas pancreáticas isoladas

Cerca de 150 a 200 ilhotas foram coletadas, transferidas aos *ependorfs* e homogeneizadas em sonicador com tampão de extração gelado constituído de Triton-X100, 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a

centrifugação, os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando-se o reagente de *Bradford* (BRADFORD, 1976) e, em seguida, foram tratados com tampão de *Laemmli* (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 5:1 (V:V). As amostras extraídas e estocadas com o tampão de *Laemmli* foram incubadas em banho-maria, à temperatura de ebulição da água por 5 minutos. Em seguida, alíquotas dessas amostras juntamente com um marcador de peso molecular pré-corado, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (8,5% ou 12%).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose por 2 horas à 120 V (VERAS et al., 2014). Imediatamente após essa etapa, as membranas foram coradas com vermelho de *Ponceau*, bem como os respectivos géis com azul de *Coomassie* para observação da qualidade e eficácia da transferência. As membranas foram descoradas em tampão TBS-T (20 mM de Tris-HCl, 137 mM de NaCl, pH 7,4, contendo 0,2% de Tween-20). A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5% em TBS-T) à 4 °C durante a noite ou à temperatura ambiente por, pelo menos, 4 horas. As membranas que não apresentaram bolhas ou outros defeitos técnicos foram incubadas com anticorpos específicos: Anti-SOD1, anti-GLUT2, anti-PDX1, anti-eNOS diluição 1:1000) e anti- α -Tubulina (diluição 1:2000), como controle constitutivo, em solução bloqueadora acrescido de BSA a 3% por 4 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas com esta mesma solução sem leite ou BSA (basal), por 3 etapas de 10 minutos cada. Após essa etapa, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário, anti-IgG correspondente, marcado com peroxidase, por 1 hora, à temperatura ambiente. Finalmente as membranas foram lavadas novamente com solução basal na mesma proporção temporal e posteriormente reveladas. Para revelação, as membranas imediatamente após a última sessão de lavagem foram expostas ao reagente ECL e as bandas imunorreativas foram capturadas pelo aparelho *Image Quant 350*. A análise quantitativa das bandas

foi feita por densitometria com o auxílio do programa *ImageJ*. Os resultados obtidos foram relativizados pelo constitutivo em cada membrana e apresentados como percentual do controle.

2.13 Análise da expressão de resíduos protéicos de nitrotirosina (NT) por *SLOT BLOT*

Cerca de 150 à 200 ilhotas pancreáticas foram homogeneizadas em 250 µl de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo PMSF 1 mM e leupeptina 10 µg/ml, durante 30 segundos e, em seguida, centrifugadas durante 5 minutos a 1000g e 4 °C. Esse procedimento foi adaptado de (TSUHAKE et al., 2010). A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada conforme descrito no item 2.13. Alíquotas contendo aproximadamente 2,5 µg de proteína total foram aplicadas sobre uma membrana de nitrocelulose através do sistema *slot blot*, à vácuo. De forma similar ao item 2.12, após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de *Ponceau* e fotografadas a fim de verificar-se a eficiência da transferência, subsequentemente descorada e submetida a incubação com TBS-T acrescida de caseína a 0,2% por uma hora, sob agitação contínua. Após este período, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário antinitrotirosina (camundongo), na diluição de 500 ng/mL em TBS-T, durante 16 horas sob agitação contínua a 18 °C.

As membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:4000 em TBS-T, por duas horas. As membranas foram posteriormente lavadas com TBS-T e submetidas ao mesmo protocolo para detecção e quantificação das bandas imunorreativas (2.12), porém com uso do Chemilmager 5500 para captura das imagens. Os resultados foram expressos como variação percentual em relação ao grupo controle, previamente relativizado pelas imagens adquiridas com o corante *Ponceau*.

2.14 Determinação da atividade da arginase em ilhotas pancreáticas isoladas

A medida da atividade de arginase foi realizada de acordo com (CORRALIZA et al., 1994), com algumas modificações. Brevemente, 120 µL dos homogenatos de ilhotas, preparados para atividade de NOS, foram incubados em estufa a 55 °C por 10 minutos juntamente com 120 µl de uma solução 10 mM de MnCl₂ preparada em Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Após o término da incubação, os tubos foram colocados em gelo e receberam 240 µl de uma solução de L-arginina 0,5 M preparada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 9,7. Em seguida, 100 µl dessa mistura foram pipetados em 4 tubos tipo *ependorf* de 600 µl, sendo que 2 deles foram mantidos em gelo (correspondente ao branco da amostra) e 2 deles foram incubados durante 1 hora a 37 °C em banho maria.

Após o período de incubação, todos os tubos foram colocados em gelo e então receberam 500 µl de uma solução ácida que continha H₂SO₄, H₃PO₄ e H₂O em uma proporção de 1:3:7. Sob proteção contra a luz, 25 µl de ISPF 9% (alpha-isonitrosopropiofenona), dissolvidos em etanol absoluto foram adicionados aos tubos. Em paralelo, uma curva de uréia foi preparada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 com concentrações entre 0,13 e 8,32 mM. Em seguida, os tubos foram vedados e submetidos a uma nova incubação à 100 °C durante 45 minutos em banho de água fervente. Após esse período, 200 µl da mistura de reação foram pipetados em microplacas de *Elisa* e os valores de absorbância a 540 nm foram registrados. A atividade de arginase foi expressa em nanomoles de uréia produzidos por minuto por miligramas de proteínas.

2.15 Análise estatística

Os dados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM). Os efeitos da dieta e do treinamento ao longo das semanas (i.e. massa corporal e ingestão alimentar) ou minutos (i.e. teste de tolerância à glicose e

sensibilidade à insulina) foram analisados por meio de ANOVA (2 x 2; dieta vs treino) para medidas repetidas, com correção de *Bonferroni* para comparações múltiplas e correção de *Greenhouse-Geisser* quando de violações de esfericidade (teste de Mauchly). ANOVA Two-way (2 x 2; dieta vs treino) foi utilizada para verificar o efeito da dieta e do treinamento sobre as demais variáveis. Importante, uma vez que o principal objetivo do presente estudo foi identificar os efeitos de interação entre dieta e treinamento, mais do que os efeitos principais, isolados, da dieta HFDS ou do treinamento, efeitos principais foram reportados apenas quando relevantes para a compreensão do modelo estudado. Neste caso, efeitos principais relevantes foram identificados pelo símbolo * e #, para dieta e treinamento respectivamente. Resultados foram considerados significantes sempre que $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização do modelo de obesidade induzida pela dieta HFDS

A figura 2 - A representa o registro da massa corporal semanal para cada grupo de animais. A análise estatística confirmou efeitos da dieta ($P < 0,001$) aumentando e do treinamento atenuando o ganho da massa corporal (figura 2B; $P < 0,001$). Foi detectada interação no grupo de animais HFDS com maior massa corpórea que aqueles do grupo C à partir da semana 2 (HFDS: $27,3 \pm 0,4g$ vs C: $24,1 \pm 0,4g$; $P < 0,001$), e redução nos grupos CTR (HFDS: $27,3 \pm 0,4g$ vs CTR: $24,6 \pm 0,6g$ ($P < 0,001$) e HFDSTR (HFDS: $27,3 \pm 0,4g$ vs HFDSTR: $24,4 \pm 0,34g$) ($P < 0,01$). Ademais, o grupo HFDSTR apresentou massa corporal aumentada apenas nas semanas 7 e 8, comparado aos camundongos CTR ($P < 0,05$) (Figura 2 - A). A AUC correspondente (ver anexo 1) confirmou os efeitos principais da dieta ($P < 0,001$) e do treinamento ($P < 0,001$) e a maior massa corpórea em HFDS (HFDS: 245 ± 4 vs C: 202 ± 3 ; $P < 0,001$), (HFDS: 245 ± 4 vs CTR: 199 ± 5 ; $P < 0,001$) e (HFDS: 245 ± 4 vs HFDSTR: 209 ± 4 ; $P < 0,001$, efeito de interação) (Figura 2-B). Ademais, analisando-se o *slope* referente à curva de ganho ponderal detectou-se aumento de 1,6 gramas de peso médio por semana para os camundongos do grupo HFDS contra 0,6, 0,3 e 0,7 gramas para os grupos C, CTR e HFDSTR, respectivamente ($P < 0,05$) (Figura 2 - A).

Figura 2 – Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a evolução ponderal de camundongos C57Bl6. Painel A é o slope da massa corporal (g) durante as 8 semanas de experimentação. *Dieta ($P < 0,001$); #treinamento ($P < 0,001$); &Interação entre C vs HFD ($P < 0,001$), CTR vs HFDS ($P < 0,05$) e HFDS vs HFDSTR ($P < 0,05$). $n = 20-31$. Painel B é o ganho de massa corporal dos grupos experimentais. *Dieta ($P < 0,001$); #treinamento ($P < 0,001$); ^aInteração entre HFDS vs demais grupos ($P < 0,01$), ^bInteração entre HFDSTR vs CTR e HFDSTR vs HFDS ($P < 0,01$). $n = 20-31$. Respostas são reportadas como média ($\pm$ EPM).

A dieta hipercalórica induziu aumento de peso relativo no tecido adiposo subcutâneo inguinal e no fígado ($P < 0,001$), sem quaisquer diferenças relacionadas ao treinamento, ou efeito de interação (tabela 1). Por outro lado, nos depósitos adiposos viscerais epididimal e retroperitoneal houve efeito da dieta ($P < 0,001$), aumentando, e do treinamento ($P < 0,05$), atenuando-os sem efeito de interação entre os grupos (tabela 1). Nos músculos esqueléticos avaliados houve efeitos distintos. O músculo gastrocnêmio apresentou apenas o efeito principal do treinamento ($P < 0,05$) com aumento do peso relativo ($P < 0,05$) (tabela 1). O músculo *soleus* apresentou aumento de 1,4 vezes no grupo HFDSTR em relação ao HFDS (HFDSTR: $0,08 \pm 0,01g$ vs HFDS: $0,06 \pm 0,01g$, efeito de interação, $P < 0,05$) (tabela 1).

Tabela 1 - Peso dos tecidos normalizados para o peso corporal total dos animais.

Orgãos e Tecidos	C	CTR	HFDS	HFDSTR	Dieta (P)	Treinamento (P)	Interação (P)
G. Epididimal	1,98 $\pm$ 0,16	1,67 $\pm$ 0,26	4,43 $\pm$ 0,45	3,24 $\pm$ 0,41	< 0,001	< 0,05	> 0,05
G. Inguinal	1,72 $\pm$ 0,25	1,54 $\pm$ 0,29	3,52 $\pm$ 0,60	2,54 $\pm$ 0,45	< 0,01	> 0,05	> 0,05
G. Retroperitoneal	1,22 $\pm$ 0,20	0,86 $\pm$ 0,13	2,74 $\pm$ 0,34	1,97 $\pm$ 0,27	< 0,001	< 0,05	> 0,05
Soleus	0,07 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	> 0,05	> 0,05	< 0,05
Gastrocnêmio	0,83 $\pm$ 0,10	1,0 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05
Fígado	6,01 $\pm$ 0,19	6,17 $\pm$ 0,25	4,96 $\pm$ 0,13	5,04 $\pm$ 0,14	< 0,001	> 0,05	> 0,05

Nota: G. Significa gordura. Dados relatados como mg/g de massa corporal (média $\pm$ EPM). Efeitos de interação ocorreram no músculo Soleus (n=7-18) entre HFDS vs HFDSTR.

Tabela 2 – Avaliação sanguínea da insulina, glicose, TG totais, colesterol total, ALT, AST e razão AST/ALT e medidas de tolerância à glicose (GTT) e sensibilidade à insulina (índices HOMA) dos animais C, CTR, HFDS, HFDSTR.

Parâmetros	C	CTR	HFDS	HFDSTR	Dieta (P)	Treinamento (P)	Interação (P)
Insulinemia (ng/dl)	0,71+0,04	0,7+0,05	1,0+0,10	0,7+0,06	< 0,05	< 0,05	< 0,01
Glicemia (mg/dl)	171+6,6	162+5,0	245+6,5	184+4,0	< 0,0001	< 0,001	< 0,001
HOMA-IR (UA)	2,32+0,16	2,4+2,68	3,5+0,30	2,68+0,32	< 0,05	> 0,05	> 0,05
HOMA-β (UA)	66,8+3,20	54,4+4,2	90,3+1,60	52,0+6,1	< 0,05	< 0,01	< 0,001
TG (mmol/L)	1,40+0,08	1,6+0,05	1,3+0,03	1,70+0,08	< 0,0001	> 0,05	> 0,05
CT (mmol/L)	4,5+0,03	4,50+0,03	4,6+0,02	4,4+0,06	> 0,05	< 0,001	> 0,05
ALT (UI/ml)	1,1+0,05	1,1+0,04	1,4+0,12	1,3+0,07	< 0,05	> 0,05	> 0,05
AST (UI/ml)	1,1+0,06	1,1+0,04	1,2+0,10	1,26+0,20	> 0,05	> 0,05	> 0,05
AST/ALT	1,0+0,02	1,0+0,007	1,1+0,06	1,05+0,01	> 0,05	> 0,05	> 0,05

TG significa triglicérides. CT é Colesterol Total (média + EPM). Efeitos de interação foram observados para a insulinemia (n=6-9) entre C vs HFDS (P < 0,01), CTR vs HFDS (P < 0,01); HFDS vs HFDSTR (P < 0,01), para a glicemia (n=15-25) entre C vs HFDS (P < 0,001), CTR vs HFDS (P < 0,001), HFDS vs HFDSTR (P < 0,001) e para HOMA-β (n=4-11) entre C vs HFDS (P < 0,05), CTR vs HFDS (P < 0,001), HFDS vs HFDSTR (P < 0,001). AST/ALT: fator dieta P = 0,0554.

3.2 Variáveis envolvidas com o balanço energético

O perfil da ingestão alimentar ao longo das 8 semanas e a AUC correspondente dos grupos experimentais estão representados nas figuras 3. A análise estatística identificou o efeito tanto da dieta ($P < 0,001$), quanto do treinamento, induzindo diminuição da ingestão alimentar ($P < 0,01$). A interação ($P < 0,001$) identificou que os animais HFDS e os HFDSTR ingeriram menos ração em relação aos grupos C e CTR, à partir da semana 1 até a 8 ($P < 0,01$). Adicionalmente, foi observado efeito da dieta ($P < 0,001$) com aumento do consumo hídrico (figura 3).

Figura 3 – Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a ingestão alimentar e consumo hídrico dos camundongos C57Bl6. Painel A é a ingestão alimentar durante as 8 semanas de experimentação. *Dieta ($P < 0,001$); #treinamento ($P < 0,001$). $n = 13-15$. Painel B é a área sob a curva da ingestão alimentar (AUC) dos grupos experimentais. *Dieta ($P < 0,001$); #treinamento ($P < 0,001$). $n = 13-15$. Painel C é o consumo hídrico durante as 8 semanas de experimentação. *Dieta ($P < 0,001$); ^aInteração entre C vs HFDS (semanas 1 – 8), C vs HFDSTR (semanas 2 - 8) ($P < 0,001$), ^bInteração entre CTR vs HFDS e CTR vs HFDSTR (semanas 2 - 8) ($P < 0,001$). Painel D é o consumo hídrico (AUC) dos grupos experimentais. *Dieta ($P < 0,001$). $n = 9-10$. Respostas são reportadas como média ($\pm$ EPM).

A ingestão calórica resultante da ingestão alimentar e da sacarose da água de beber foi menor nos animais alimentados com a HFDS (efeito da dieta, $P < 0,001$; Figura 4). Os camundongos HFDS apresentaram menor consumo energético comparado ao grupo C (HFDS: 164 ± 4 kcal vs C: 179 ± 4 kcal; interação, $P < 0,01$), e aumentado consumo calórico comparado aos animais HFDSTR (HFDS: 164 ± 4 kcal vs HFDSTR: 150 ± 2 kcal; interação, $P < 0,05$). Além disso, os animais HFDSTR consumiram em média 19 kcal à menos que o CTR ($P < 0,001$) (Figura 4).

Além dos efeitos principais da dieta ($P < 0,001$) e do treinamento ($P < 0,001$), aumentando e atenuando, respectivamente, a eficiência alimentar (CEA), aqueles relacionados à interação ($P < 0,01$) constataram aumento de aproximadamente 2 vezes para os animais C vs grupo CTR ($P < 0,01$); 2,4 vezes para HFDS vs C ($P < 0,001$) e cerca de 5 vezes para HFDS vs CTR ($P < 0,0001$). Já o grupo HFDS apresentou valor de CEA próximo a 1,5 vezes maior em comparação aos HFDSTR ($P < 0,001$), e, ainda, houve significância em relação ao CEA dos HFDSTR, em cerca de 2, 5 vezes maior que nos animais controle + treino ($P < 0,001$) (Figura 4).

Figura 4 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre o consumo energético e o CEA dos camundongos C57Bl6. Painel A é o consumo energético dos grupos experimentais. *Dieta ($P < 0,001$); ^aInteração entre C vs HFDS, C vs HFDSTR, ^bInteração entre CTR vs HFDS, CTR vs HFDSTR ($P < 0,05$). $n=8-10$. Painel B é CEA dos grupos experimentais. *Dieta ($P < 0,001$); [#]treinamento ($P < 0,001$); ^aInteração entre C vs CTR, C vs HFDS ($P < 0,001$), ^bInteração entre HFDS vs demais grupos ($p < 0,001$); ^cInteração entre HFDSTR vs CTR ($P < 0,001$). $n=10$. Respostas são reportadas como média ($\pm$ EPM).

Nesse estudo, tanto a temperatura central, quanto a perda de peso induzida por jejum de 12 horas, também mensuradas ao final das 8 semanas, não foram afetadas pelos fatores principais, dieta e treinamento, ou por efeito de interação (Figura 5).

Figura 5 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a perda de peso e temperatura retal dos camundongos C57Bl6. Painel A é a perda de peso induzida por jejum de 12 horas ao final da 8ª semana do protocolo experimental, nos grupos experimentais. n=8-9. Painel B é a temperatura retal após jejum de 12 horas ao final da 8ª semana do protocolo experimental nos grupos experimentais (Anova 2 vias). n=8-9. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM).

3.3 Exercício moderado e eficácia do treinamento

O teste de esforço máximo em esteira foi semelhante entre os grupos de animais na semana 0 ($P > 0,05$; Figura 6 A). No entanto, ao final da semana 8, tanto os grupos CTR, como o HFDSTR, aumentaram o tempo de exaustão em cerca de 57 % dos seus respectivos tempos na semana 0 (CTR Sem 0: $7,6 \pm 0,5$ min vs CTR Sem 8: 12 ± 1 min; $P < 0,001$ e HFDSTR Sem 0: $7,8 \pm 0,4$ min vs HFDSTR Sem 8: $12 \pm 0,9$ min; $P < 0,001$), comparados ao aumento de apenas 18 % para os grupos C e HFDS (C Sem 0: $7,5 \pm 0,4$ min vs C Sem 8: $9 \pm 0,6$ min; $P < 0,001$ e HFDS Sem 0: $7,6 \pm 0,4$ min vs $9 \pm 0,5$ min; $P < 0,001$) (Figura 6 A).

A atividade enzimática da citrato sintase no músculo gastrocnêmio, mensurada ao final da semana 8, foi afetada pelo treinamento ($P < 0,001$) (Figura 6B). A atividade citrato sintase foi cerca de 1,6 vezes maior para os animais CTR vs C ($P < 0,01$) e 1,3 vezes maior nos animais HFDSTR vs HFDS ($P < 0,01$; Figura 6 B).

Figura 6 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre o tempo de exaustão e a atividade da citrato sintase dos camundongos C57Bl6. Painei A é o tempo máximo até a exaustão no teste em esteira. Diferença observada entre a semana 8 vs a semana 0 nos grupos Δ CTR e HFDSTR ($P < 0,001$). $n = 10$. Painei B é a atividade da enzima citrato sintase no músculo gastrocnêmio nos grupos experimentais. #treinamento ($P < 0,001$). $n = 8-9$. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM).

3.4 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (IPGTT) e à insulina curto (K_{ITT}).

Com o intuito de avaliar se o treinamento utilizado no presente estudo, teve um impacto sobre parâmetros sistêmicos relacionados ao metabolismo energético, foram analisadas a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina através do ITT curto e calculo da constante de decaimento da glicose (K_{ITT}). Tanto a glicemia basal, como a AUC correspondente ao GTT, foram aumentados pelo fator dieta ($P > 0,05$). Por outro lado, houve efeito do treinamento ($P < 0,01$) minimizando esse aumento (Figuras 7 A e B).

O perfil temporal do GTT demonstrou reduzida eliminação da glicose plasmática no grupo HFDS detectado precocemente a partir de 30 minutos após a infusão de glicose e mantendo-se até o final do teste ($P < 0,001$) (Figura 7 A). O grupo HFDS apresentou aumento da AUC em cerca de 61 %, comparado ao grupo C, e em cerca de 55 % comparado ao grupo HFDSTR ($P < 0,001$, efeito de interação) (Figura 7 B). Adicionalmente, o grupo CTR apresentou uma AUC 47 % menor comparada à do grupo HFDSTR ($P < 0,001$, efeito de interação) (Figura 7 B).

A constante de decaimento da glicose induzida pela insulina exógena injetada, K_{ITT} , foi diminuída pela dieta hipercalórica ($P < 0,001$), sem efeito do treinamento. Por outro lado, foi detectada redução em torno de 2,3 vezes do K_{ITT} dos animais HFDS em comparação ao do grupo C (HFDS: $6,4 \pm 0,8 \text{ } \%/ \text{min}^{-1}$ vs $2,7 \pm 0,5 \text{ } \%/ \text{min}^{-1}$; $P < 0,01$, efeito de interação). Ademais, esses resultados propõem que o treinamento melhorou a sensibilidade à insulina uma vez que a constante foi 1,9 vezes maior para o grupo HFDSTR do que nos HFDS (HFDSTR: $5,2 \pm 0,6 \text{ } \%/ \text{min}^{-1}$ vs HFDS: $2,7 \pm 0,4 \text{ } \%/ \text{min}^{-1}$; $P < 0,05$, efeito de interação) (Figura 7 C).

Figura 7 - Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina nos grupos experimentais, ao final do período experimental. Painel A é o GTT (teste de tolerância oral à glicose realizado ao final da semana 8). ^sInteração entre C vs CTR (15 e 30 min) ($P < 0,001$), ^{&+}Interação entre C vs HFDS (30 à 120 min) ($P < 0,001$), entre CTR vs HFDS (0 à 120 min) ($P < 0,001$), e entre HFDS vs HFDSTR (30 à 120 min) ($P < 0,001$). ⁺Interação entre CTR vs HFDSTR (15 à 60 min) ($P < 0,001$). $n=8-11$. Painel B é GTT (AUC) ao final do período experimental. *Dieta ($P < 0,001$); [#]treinamento ($P < 0,001$); ^aInteração C vs demais grupos ($P < 0,001$); ^bInteração entre CTR vs HFDSTR ($P < 0,001$). $n= 8-11$. Painel C é o Kitt ao final do período experimental. *Dieta ($P < 0,0001$); ^aInteração entre HFDS vs demais grupos ($P < 0,05$). $n= 9-16$. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM).

3.5 Dosagens séricas

A tabela 2 descreve os valores séricos dos analitos avaliados, bem como as razões: HOMA-IR, HOMA β e AST/ALT. A insulinemia, a trigliceridemia e a enzima ALT estiveram elevadas por efeito da dieta ($P < 0,05$). A interação indicou 43% de aumento na glicemia de jejum dos animais HFDS, em comparação ao grupo C ($P < 0,001$), enquanto os HFDSTR apresentaram 25% de redução em relação ao grupo HFDS ($P < 0,001$) (tabela 2). Esse efeito foi refletido nos aumentos dos índices HOMA-IR e HOMA β . Ao lado do efeito da dieta, que aumentou, ($P < 0,05$) e do treinamento ($P < 0,05$), minimizando o aumento no índice, o HOMA- β , variável que avalia a resposta secretora de insulina frente a glicemia de jejum, apresentou efeito de interação ($P < 0,05$) com aumento em torno de 35 % para o grupo HFDS, quando comparado ao C ($P < 0,01$)(tabela 2). Por outro lado, houve 43% de redução nesse índice para os animais HFDSTR, comparados aos HFDS ($P < 0,01$)(tabela 2). A colesterolemia foi elevada em função do treinamento ($P < 0,01$). Ao lado desses achados, houve uma tendência estatística ao aumento da razão AST/ALT no grupo alimentado com a dieta hipercalórica (tabela 2). Ademais, a mensuração dos TBARS no plasma ao final do período experimental foi semelhante entre os grupos ($P > 0,05$) (figura 8).

Figura 8 - Concentração sérica de TBARS coletadas ao final do período experimental. n=6-8. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM).

3.6 Viabilidade celular das ilhotas pancreáticas

A figura 9 A representa o percentual de células viáveis ao final de 8 semanas de treinamento. Tanto a dieta ($P < 0,001$), como o treinamento, interferiram no percentual de células viáveis ($P < 0,01$), diminuindo e impedindo a diminuição do número de células viáveis, respectivamente. Nesse sentido, observou-se uma diminuição de 31% das células viáveis nas ilhotas pancreáticas após o consumo da dieta HFDS (Figura 9 A). Em contrapartida, as células das ilhotas pancreáticas do grupo HFDSTR apresentaram 63% a mais de células viáveis que as do grupo HFDS (Figura 9 A).

O gráfico da figura 9 B demonstra que o percentual de células em apoptose fora afetado pelo fator dieta ($P < 0,01$) sem quaisquer efeito do treinamento. A interação ($P < 0,01$) revelou um aumento de 59% dessas células para o grupo HFDS comparado às células dos animais C e uma diminuição de 20% de células em apoptose nas ilhotas do grupo HFDTR vs HFDS (figura 9 B). Uma vez mensurada a fragmentação de DNA, verificou-se que a dieta ($P < 0,01$) aumentou a fragmentação do DNA assim como o efeito do treinamento ($P < 0,001$) foi o de atenuar a fragmentação (Figura 9 C). A interação ($P < 0,01$) demonstrou aumento em 3,9 vezes na fragmentação de DNA das ilhotas pancreáticas do grupo HFDS, comparado às células do grupo

C (Figura 9 C). Por outro lado, esse percentual encontrou-se cerca de 100 vezes reduzido nas células HFDTR comparado àsquelas do HFDS (Figura 9 C).

Figura 9 - Viabilidade celular em ilhotas pancreáticas ao final do período experimental. Painel A é o percentual de células viáveis. *Dieta ($P < 0,001$); #treinamento ($P < 0,01$); ^aInteração entre HFDS vs demais grupos ($P < 0,01$). $n = 6-11$. Painel B é o percentual de células em apoptose por citometria. *Dieta ($P < 0,01$); ^ainteração entre HFDS vs demais grupos ($P < 0,01$). Painel C é a fragmentação de DNA; *Dieta ($P < 0,001$); #treinamento ($P < 0,01$); ^aInteração entre HFDS vs demais grupos ($P < 0,01$). $n = 6-11$. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM).

3.7 Funcionalidade da célula β : secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS)

Considerando que o treinamento teve um impacto positivo na prevenção da morte celular, assim como, na manutenção da glicemia e sensibilidade à insulina, foi analisada a capacidade das células β pancreáticas de secretar insulina em resposta à glicose. As ilhotas pancreáticas dos grupos C e CTR foram, cerca de 2 vezes mais responsivas ao estímulo da glicose ($P < 0,01$), enquanto, as do grupo HFDS, tiveram sua capacidade de resposta perdida ($P > 0,05$). Em contrapartida, o treino imposto ao grupo HFDSTR, induziu resposta semelhante à observada nas ilhotas do grupo C, portanto, o dobro da GSIS em 16,7 mM de glicose, comparada à 2,8 mM ($P < 0,01$) (Figura 10 A). Além disso, o cálculo do incremento, representado como delta (Figura 10 B), ilustra tanto os efeitos principais da dieta ($P < 0,001$) e treinamento ($P < 0,05$), mas também a interação ($P < 0,01$) entre a GSIS das ilhotas do grupo HFDS, diminuída em aproximadamente 2 vezes, em 16,7 mM, comparado aos grupos C, CTR e HFDSTR (Figura 10 B).

Figura 10 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre GSIS dos camundongos C57Bl6. Painei A é a secreção de insulina estimulada por baixa (2,8 mM) e alta (16,7 mM) concentração de glicose das ilhotas pancreáticas após período o experimental. ^πGlicose 2,8 vs 16,7mM nos grupos C, CTR, HFDSTR ($P < 0,01$); ^aInteração entre HFDS vs demais grupos em 16,7 mM ($P < 0,05$). $n=5-7$. Painei B é a diferença (delta) da GSIS entre as concentrações de 16,7 mM e 2,8 mM de glicose. *Dieta ($P < 0,001$); [#]treinamento ($P < 0,001$); ^aInteração entre HFDS vs demais grupos ($P < 0,01$). $n=5-7$. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM).

3.8 Conteúdo de etídio em células dispersas de ilhotas isoladas

A intensidade de fluorescência emitida ou o conteúdo de etídio pelo DHE produzido pelas células dispersas das ilhotas pancreáticas dos grupos fora aumentada em todos os grupos na presença de baixa concentração de glicose (2,8 mM) em relação àquela detectada em exposição à alta concentração de glicose (16,7 mM). (figura 11). Não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Figura 11 - Conteúdo de etídio avaliado pela intensidade média de fluorescência emitida pelo diidroetídio (DHE) em células dispersas de ilhotas isoladas, após 1 hora do estímulo em baixa (2,8 mM) e alta (16,7 mM) concentração de glicose, nos grupos experimentais (quantificação feita na 8ª semana do período experimental). ^πGlicose na concentração de 2,8 mM vs 16,7 mM nos grupos C, CTR, HFDS e HFDSTR ($P < 0,001$). n=5-10.

3.9 Atividade da arginase

Tanto a dieta quanto o treinamento não tiveram impacto isoladamente sobre a atividade da arginase. Por outro lado, houve efeito de interação ($P < 0,05$) entre os grupos, sendo que a atividade da arginase no homogenato das ilhotas pancreáticas do grupo C foi cerca de 3,3 e 2,5 vezes maior que naquelas dos animais CTR e HFDS, respectivamente ($P < 0,05$) (Figura 12).

Figura 12 - Atividade da arginase em ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais, coletadas ao final do período experimental. ^aInteração entre C vs CTR e entre C vs HFDS ($P < 0,05$). $n=3-5$. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM).

3.10 Análise de proteínas contendo resíduos de nitrotirosina (3-NT)

A nitração de resíduos de tirosina em proteínas celulares (3-NT) é usado como biomarcador indicativo de estresse oxidativo por RNS. A figura 13^A apresenta uma imagem representativa dessa avaliação. A comparação de 3 experimentos semelhantes ao painel demonstrou que o conteúdo de proteínas com resíduos de nitrotirosina foi semelhante entre os grupos do estudo (Figura 13 B).

Figura 13 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a expressão de nitrotirosina dos camundongos C57Bl6. Painel A é o *Slot blot* [expressão de nitrotirosina (NT) no extrato de proteína de ilhotas pancreáticas] após o período experimental nos grupos experimentais. Bandas coradas com ponceau foram utilizadas para normalizar o controle. NTBSA (albumina nitrada de soro bovino) e BSA e foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. n=3-5. Painel B é a expressão de NT. n=3-5. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM).

3.11 Análise da expressão protéica da SOD1, eNOS, PDX1 e GLUT2 em ilhotas pancreáticas isoladas

A figura 14 A ilustra uma imagem resultante de imunoblotting típico com anticorpos anti-SOD1, anti-eNOS, anti-PDX-1, anti-GLUT2 e anti-tubulina em amostras de extratos citoplasmáticos de ilhotas pancreáticas submetidas previamente a SDS-PAGE. A análise de 3 experimentos semelhantes aos apresentados demonstrou que não houve efeito principal da dieta nem do treinamento sobre a expressão protéica da SOD1 ($P > 0,05$). Em contrapartida, a interação ($P < 0,01$) detectou aumento de $3,3 \pm 1,6$ vezes nas ilhotas dos animais C vs CTR e de cerca de $3 \pm 2,7$ vezes naquelas dos animais C vs HFDS ($P < 0,05$). Além disso, verificou-se aumento de $3,3 \pm 3$ vezes em HFDSTR

vs CTR ($P < 0,05$) e de 3 ± 5 vezes para HFDSTR vs HFDS ($P < 0,05$) (figura 14 B).

Ademais, a expressão protéica da e-NOS foi semelhante entre os grupos (Figura 14C) e a expressão protéica da PDX1 aumentou em decorrência do efeito principal da dieta ($P < 0,05$), (figura 14 D).

Ademais, a expressão do GLUT2 (figura 14 C) foi aumentada em cerca de 3 vezes no grupo dos animais HFDSTR comparado aos grupos CTR e HFDS ($P < 0,05$, efeito de interação) (figura 14 C).

Figura 14 - Efeito da dieta hipercalórica (HFDS) e do treinamento aeróbio moderado sobre a expressão de SOD1, e-NOS, PDX1 e GLUT2 nas ilhotas pancreáticas dos camundongos C57Bl6. Painel A é a expressão protéica da SOD1, eNOS e PDX1 no extrato de proteína de ilhotas pancreáticas após o período experimental, nos grupos experimentais.. Painel B é a expressão da SOD1. ^aInteração entre C vs CTR, entre C vs HFDS ($P < 0,05$); ^bInteração entre HFDSTR vs CTR, entre HFDSTR vs HFDS ($P < 0,05$). $n=5$. Painel C é a expressão da e-NOS. $n=3$. Painel D é a expressão da PDX1. *Dieta ($P < 0,001$). $n= 4-5$. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM). Painel E é a expressão protéica do GLUT2. ^aInteração entre HFDSTR vs CTR, e entre HFDSTR vs HFDS ($P < 0,05$). $n= 4-6$. Dados são reportados como média ($\pm$ EPM). Constitutivo α -tubulina foi utilizado para normalizar o controle.

4 DISCUSSÃO

O objetivo principal desse estudo foi investigar a hipótese de que a interação entre o treinamento físico de intensidade moderada e por tempo relativamente reduzido, pudesse prevenir o desenvolvimento dos efeitos deletérios no metabolismo, consequentes da ingestão crônica de uma dieta rica em lipídio e sacarose. Em linhas gerais, a dieta utilizada foi uma simulação da dieta ocidental clássica, consumida em demasia e de forma habitual pelos seres humanos. Essa dieta é composta por alimentos pobres em fibras, altamente refinados, ricos em ácidos graxos saturados e açúcares (CORDAIN et al., 2005). Já o protocolo de treinamento utilizado refletiu a recomendação geral mínima feita pelo *ACSM* para a maioria dos adultos praticar, pelo menos, 150 minutos de exercício de intensidade moderada por semana (GARBER et al., 2011). Em particular, o foco desse estudo esteve sobre a viabilidade celular, bem como a funcionalidade das ilhotas pancreáticas, em camundongos.

Várias espécies animais têm sido estudadas como modelos para os mais diferentes protocolos experimentais, com o intuito de melhor entender a complexidade que envolve a gênese da obesidade e suas complicações metabólicas (SATO MITO et al., 2009; SUMIYOSHI et al., 2006). Dessa forma, é importante destacar que, além das semelhanças obtidas para um mesmo período de exposição à dietas com constituintes similares, também são encontradas diferenças para as mesmas variáveis metabólicas, à depender, por exemplo, da linhagem do modelo animal e do tempo de exposição às mesmas (MONTGOMERY et al., 2013).

A resistência à insulina, induzida pelo consumo crônico de dietas hiperlipídicas ou hipercalóricas, é tecido-específica (KLEEMANN et al., 2010; MONTGOMERY et al., 2013; TURNER et al., 2013). Nesse sentido, PRADA et al. (2005), propuseram uma sequência na qual a resistência à insulina se instalaria em diversos tecidos. Inicialmente, ou seja, 10 dias após o consumo da dieta ocidental (38% de carboidratos, 15% proteína e 46,5% de gordura), foram afetados o hipotálamo e músculo esquelético, determinados pela atenuação do efeito anorexígeno e redução do transporte de glicose induzidos pela insulina, respectivamente. Posteriormente, 30 dias do consumo da dieta, o

tecido hepático foi comprometido através de uma menor resposta supressiva da produção de glicose induzida pela insulina. Finalmente, o tecido adiposo apresentou resistência à insulina, trazendo consigo uma diminuição na capacidade de “tamponar” lipídios circulantes, facilitando, conseqüentemente, o estoque ectópico de gordura.

Nesse modelo experimental, as alterações temporais na ação da insulina foram acompanhadas por ativação de vias intracelulares relacionada ao estresse e inflamação como JNK e a fosforilação do IRS-1 no resíduo ser³⁰⁷. Ademais, houve redução da via PI3-K/Akt, induzida pela insulina, principalmente no hipotálamo, músculo e fígado. O resultado disso foi o desenvolvimento de adiposidade aumentada e RI nos ratos alimentados com a dieta do tipo ocidental.

No presente estudo, mesmo com protocolo de tempo reduzido para 30 minutos, o treinamento físico atenuou o ganho de massa corpórea induzido pela dieta. Isso pode estar associado, inclusive, ao menor CEA encontrado nos animais HFDSTR em relação aos sedentários e que se alimentaram com a dieta. Um importante achado do estudo foi o de que, pela primeira vez, mostrou-se que tanto a viabilidade celular das ilhotas pancreáticas, como a GSIS puderam ser mantidas, o que caracteriza um efeito de prevenção e não de tratamento. Diante do atual cenário do perfil da população mundial, nossos resultados indicam um estilo de vida mais ativo como forma de minimizar os efeitos deletérios de uma alimentação hipercalórica, encontrada cada vez mais precoce nos indivíduos e que pode levar à obesidade e suas complicações metabólicas (WONG et al., 2015).

O protocolo de treinamento físico adotado aqui foi eficaz, tanto do ponto de vista metabólico oxidativo, representado pelo aumento da atividade enzimática mitocondrial da citrato sintase, como sob a perspectiva de avaliação da capacidade de execução máxima do treinamento. Ademais, o treinamento impediu o ganho de massa corporal dos animais, porém sem modificar o peso do fígado destes. Outro efeito do treinamento praticado foi o aumento da massa muscular, representado pelo peso do músculo esquelético gastrocnêmio, nos animais alimentados com a dieta padrão controle e com dieta hipercalórica, à semelhança ao artigo publicado por (EVANS et al., 2014).

A reduzida ingestão alimentar associada ao aumento da ingestão da água acrescida de sacarose já fora descrita por outros autores (CHEN et al., 2011). Nesse estudo, a justificativa da menor ingestão de ração esteve associada à maior ingestão calórica devido à sacarose (30%) presente na água consumida durante 26 semanas. No entanto, no estudo atual, à despeito da alta densidade energética da ração hiperlipídica mais a sacarose da água ingerida, a média do consumo calórico, representada pela AUC para o período, ainda fora aproximadamente 10% maior para os animais alimentados com a dieta padrão. Apesar disso, a conversão da energia ingerida à ganho de peso, foi maior para os grupos alimentados com a dieta hipercalórica, sem a presença da hiperfagia. Como consequência, verificou-se que o ganho de massa corporal nesses animais foi mais precoce, já a partir da semana 2 da ingestão dessa dieta. Além disso, ao final das 8 semanas, também estiveram aumentados os pesos relativos dos tecidos adiposos epididimal, inguinal e retroperitoneal.

De fato, a prática regular do treinamento físico em tempo, volume e intensidade variados, está relacionada à melhora no quadro de adiposidade e das suas consequências ao metabolismo (EMAMI et al., 2016). É importante ressaltar que, embora o treinamento tenha reduzido os valores do coeficiente alimentar, o efeito sobre a conversão da dieta hipercalórica em ganho de peso se deu sem quaisquer restrição calórica. Ou seja, o treinamento aeróbio, realizado por somente 30 minutos de corrida, foi suficiente para atenuar o ganho de massa corporal dos animais alimentados com a dieta hipercalórica. Esse efeito se manteve por praticamente 90% do período de exposição à dieta indutora de obesidade naqueles animais treinados.

Além disso, outro achado importante refere-se à interação entre os animais CTR e HFDSTR, pois o ganho de massa corporal foi maior para HFDSTR apenas após a semana 6, ou seja, durante 75% do tempo experimental a variável foi semelhante entre os animais treinados, independentemente da dieta consumida.

Portanto, a possibilidade para explicar tais achados é a medida da temperatura central. No entanto, a ausência de diferença na temperatura retal, aferida apenas ao final das 8 semanas de experimentação, não é suficiente para excluir a idéia de que a de modificação no gasto energético dos animais tenha sido devido ao treinamento físico

Evidências demonstram que o treinamento pode influenciar o consumo de energia e, conseqüentemente, o gasto calórico. Por outro lado, há nesse mesmo estudo, ausência de consenso à respeito se a obesidade resulta principalmente da conversão metabólica do excesso de nutrientes em gordura corporal, reduzida termogênese ou ambos (ASSAAD et al., 2014). Uma possibilidade para nossos achados é que nos animais HFDS, com maior CEA e ausência do treinamento, o gasto energético deve ter sido inferior àquele do animal treinado o que favoreceu ao acúmulo de adiposidade. Em contrapartida, o treinamento minimizou o ganho de massa corporal, provavelmente em função do efeito termogênico aumentado, que culminou com menores depósitos adiposos epididimal e retroperitoneal em HFDSTR.

Convém destacar que os achados descritos nessa investigação não resultaram da perda de peso corporal, conseqüentes de terapias de tratamento, mas sim, da ausência do ganho, decorrente de um efeito de prevenção. A maioria dos estudos utiliza o treinamento como intervenção após a instalação da obesidade e, muitas vezes, ainda associado à intervenção dietética (CHURCH, 2011; DALLECK et al., 2014; FARIAS et al., 2012;).

Há várias evidências demonstrando que o excesso de adiposidade pode afetar a sensibilidade à insulina e/ou a tolerância à glicose (PARK et al., 2005). Assim esperado, a dieta hipercalórica, associada à ausência do treinamento, contribuiu para a elevação da insulinemia e glicemia nos animais. Ademais, dietas ricas em ácidos graxos saturados de cadeia longa, como o palmitato, e/ou em carboidratos como a sacarose, podem ocasionar prejuízos na funcionalidade das células β pancreáticas (CHEN et al., 2011; DUBOIS et al., 2004). Assim, de modo consistente com a hipótese desse trabalho, o protocolo de treinamento utilizado no atual estudo foi capaz de prevenir o aumento da insulinemia e da glicemia nos animais alimentados com a dieta rica em gordura saturada e sacarose.

O padrão de resposta de insulinemia a uma sobrecarga de glicose apresenta magnitude distinta se o estímulo for oral ou endovenoso, sendo maior o oral devido à ação das incretinas. No entanto, teste intravenoso ou oral de sobrecarga glicídica têm sido bastante utilizados como ferramenta para identificar defeitos da resposta secretora de insulina à glicose (CAUMO; LUZI, 2004). Humanos intolerantes à glicose, submetidos ao teste oral, apresentam

um aumento gradual da glicemia, com duração de até cerca de 1 hora da administração, que se mantém elevada até mesmo depois de 2 horas (ABDUL-GHANI et al., 2010). Nesse sentido, a intolerância à glicose, detectada ao final do protocolo experimental nos animais alimentados com a dieta hipercalórica com glicemia de jejum semelhantes, pode indicar pelo menos 4 situações: (1) que esses tenham ficado mais tempo sob a exposição de glicemia alterada após a alimentação, (2) que tenham convivido com níveis sanguíneos maiores de insulina nesse mesmo período de tempo, e/ou que (3) a produção hepática de glicose não esteja efetivamente inibida pela insulina, e (4) haja resistência à ação da insulina compensada por uma hiperinsulinemia reativa às glicemias pós-alimentares maiores. Concordante com essas possibilidades, a secreção de insulina induzida por glicose em ilhotas isoladas foi maior nos animais alimentados cronicamente com a dieta hipercalórica. E, ainda concordante com a hipótese desse trabalho, o treinamento nos animais que consumiram dieta hipercalórica manteve preservada a resposta da secreção de insulina frente à glicose.

Vários protocolos de treinamento físico estudados confirmam a sua eficácia como estratégia de tratamento não farmacológica para a melhora na sensibilidade à insulina. Nesse sentido, novos mecanismos continuam sendo investigados (ALBRIGHT et al., 2000; CHURCH, 2011; COLBERG et al., 2010). Por exemplo, DA LUZ et al. (2011) verificaram em ratos alimentados com dieta rica em gordura por 2 meses e, que posteriormente foram submetidos por mais 8 semanas à 1 hora de natação, 5 x por semana, mantiveram a sensibilidade à insulina. Tais achados foram atribuídos à redução na circulação de moléculas pró-inflamatórias, melhora funcional sobre o fígado e o tecido adiposo, sem quaisquer alteração na adiposidade e massa corporal.

Nosso estudo mostrou que a resistência à insulina induzida pela dieta hipercalórica e o sedentarismo foi prevenida pelo treinamento físico. De forma similar, OTERO-LOSADA et al. (2016) avaliaram o efeito do treinamento sobre o pâncreas de ratos que consumiram refrigerante coca cola® *at libitum*. Esses animais treinaram 6 meses, 5 x por semana, durante 30 minutos em velocidade de 20 m/min. Dentre os principais achados, estiveram a manutenção da sensibilidade à insulina, bem como a aumentada massa de célula β e preservada morfologia pancreática. A diminuição de massa de célula β é

descrita como um dos principais fatores envolvidos com a perda de função dessas células (WALI et al., 2015). Nosso estudo não avaliou as variáveis morfológicas envolvidas com a RI. Por outro lado, a dieta hipercalórica utilizada em nosso estudo gerou queda no percentual de células viáveis com correspondente aumento de células não viáveis, aumento da fragmentação de DNA e presença de apoptose nas células das ilhotas pancreáticas. O reflexo dessa redução da massa funcional das ilhotas pancreáticas foi a prejudicada resposta secretora de insulina induzida pela glicose nas ilhotas pancreáticas isoladas dos animais alimentados com a dieta hipercalórica e sedentários.

Efeitos de citotoxicidade e apoptose celular, geralmente envolvidos com estresse oxidativo, são descritos em diferentes tipos celulares. e podem ser decorrentes do excesso de nutrientes como os ácidos gaxos livres e/ou glicose (CERF, 2010; CNOP et al., 2001). Nossos resultados indicaram, pela primeira vez, que o treinamento aeróbio, mesmo quando aplicado juntamente a uma dieta desbalanceada, pôde auxiliar na manutenção da viabilidade celular, bem como para a preservação da GSIS. Sob outra perspectiva, achados recentes demonstraram que ilhotas pancreáticas de camundongos *knockout* para IL-6, treinados, apresentaram maior viabilidade celular, comparado aos sedentários (PAULA et al., 2015).

Também há estudo indicando efeitos do treinamento sobre ilhotas pancreáticas de animais alimentados com dieta padrão apresentando ativação de vias relacionadas à sobrevivência e ao crescimento celular. Nesse estudo, as proteínas identificadas foram a AKT e ERK 1/ 2, bem como vias anti-apoptóticas, como *Bcl-2*, acompanhadas de diminuição de proteínas com atividade pró-apoptóticas, como a caspase-3 clivada e Bax. (CALEGARI et al., 2012). No entanto esses estudos ainda são escassos e muito menos retratam dos efeitos de prevenção sobre a celularidade das ilhotas pancreáticas.

Como detectado nos animais HFDS do presente estudo e, em conformidade com o estudo de ROBERTSON et al. (2004), a hiperglicemia crônica, decorrente da alterada tolerância à glicose e/ou reduzida sensibilidade à insulina, representa um potencial tóxico para as células, particularmente as das ilhotas pancreáticas. No entanto, as defesas antioxidantes das células das ilhotas pancreáticas são consideradas baixas em relação a outros tecidos (TANAKA et al., 2002; TIEDGE et al., 1997). Através desse raciocínio, as

ilhas dos animais HFDS estariam em risco de falência de sua capacidade antioxidante, o que levaria ao aumento da sensibilidade ao dano oxidativo induzido pelo consumo crônico da dieta hipercalórica. Portanto, possivelmente maiores as chances de ativação de vias relacionadas à apoptose, com prejuízos sobre a GSIS (BOSLEM et al., 2013; CERF, 2010).

Nesse sentido, há evidências experimentais em ilhotas pancreáticas demonstrando que a diminuída expressão do gene da SOD1 resultou em intolerância à glicose e redução de massa e função da célula β (MUSCOGIURI et al., 2013). Nossos resultados corroboram alguns desses achados, uma vez que os animais HFDS foram intolerantes à glicose e as suas ilhotas apresentaram diminuída expressão protéica da SOD1 e perda da resposta da GSIS, mesmo sem alteração no conteúdo de etídio (ROS). Os papéis fisiológicos das enzimas antioxidantes nas células β , em diferentes condições fisiopatológicas, como no diabetes, são bastante complexos. Sabe-se que o treinamento regular pode induzir adaptações sobre o estado antioxidante nos mais variados tecidos, à depender da duração, intensidade, carga de treino, etc (POWERS; JACKSON, 2008; RADAK et al., 2008; POWERS et al., 2011).

Sob tal perspectiva, uma outra observação no atual estudo, a reduzida expressão protéica da SOD1, induzida pelo treinamento nas ilhotas dos animais controle, diferiu do observado por CALLEGARI et al. (2012). Nesse estudo não houve diferença tanto na expressão gênica quanto na expressão protéica da SOD1 em ilhotas pancreáticas de ratos wistar cuja intensidade de treino fora semelhante (60%), e o volume fora o dobro, comparado ao do nosso estudo.

Uma de nossas especulações para a regulação da SOD1 envolve o fator de transcrição Nrf2 (*nuclear erythroid-2 like factor-2*) (MA; 2013). Nrf2 pode aumentar a sobrevivência da célula β e afetar diretamente a homeostase de ROS e das espécies reativas de nitrogênio por influenciar o catabolismo de superóxido e de peróxido através da SOD e enzimas, como a catalase e GPX (MA; 2013). Também há evidências demonstrando que o treinamento induz aumento da capacidade antioxidante em tecido muscular de modo dependente desse fator (DONE et al., 2016). Além disso, Gounder et al. (2012) demonstraram aumentadas concentrações do Nrf2 e da capacidade

antioxidante em tecido cardíaco de camundongos envelhecidos e treinados, quando comparados àqueles animais jovens.

Em contrapartida e similar ao proposto por RADAK et al. (2008), as respostas celulares podem envolver o aumento na atividade de enzimas antioxidantes em função dos danos oxidativos. Portanto, sugerimos que a aumentada expressão da SOD1 nas ilhotas dos camundongos HFDSTR tenha sido decorrente do efeito da interação entre o treinamento e o agente deletério, dieta rica em lipídio e sacarose, sobre a garantia de manutenção da tolerância à glicose e GSIS.

É importante levar em consideração que os resultados podem variar de acordo com os modelos testados, ou seja, animal, humanos, sedentário, treinados, padrão de alimentação e, principalmente, em função do tipo de treinamento, do tecido e enzimas estudados (BRITES et al., 1999; MARGARITIS et al., 1997). Por exemplo, RAZA et al. (2016), encontraram aumentada produção de ROS, bem como atividade da SOD em pâncreas de ratos *GK*, sedentários. Após 8 semanas de treinamento, 1 hora por dia, 5 vezes por semana, verificaram-se efeitos benéficos sobre o metabolismo energético nesse modelo animal, como diminuída produção de ROS, atividade da SOD e aumentada GSH.

A SOD1 também pode regular a expressão de fatores transcricionais como o PDX1 e proteínas integrais de membrana celular como o GLUT2 (BABU et al., 2007). SACHDEVA et al. (2009), descreveu que o PDX1 é necessário à expansão da massa das células β em resposta a resistência à insulina induzida, por dieta hiperlipídica. Os principais efeitos envolvidos são a hipertrofia compensatória e sobrevivência da célula β . Nesse sentido, uma dieta rica em gordura (60% de gordura derivadas da banha) teve um impacto precoce sobre a replicação e massa de células β , com um aumento da quantidade de ciclina D2, proteína envolvida com a regulação do ciclo celular (STAMATERIS et al., 2013). A hiperglicemia progressiva e crônica prejudica a função das células β . Esse pode ter sido um fator importante para a redução do número de células viáveis, menor expressão da SOD1 (mesmo sem alteração na produção de ROS), que culminou com a perda da GSIS pelas ilhotas dos

animais HFDS. Do contrário, o treinamento atenuou esses efeitos no grupo HFDSTR.

Dentre os prejuízos sistêmicos da exposição prolongada ao excesso de ácidos graxos livres e/ou glicose estão os defeitos progressivos e deletérios sobre os processos de biossíntese e secreção de insulina. De acordo com (CAPITO et al., 1992; MULDER et al., 2000), reduções na função das células β também estão fortemente relacionadas à diminuição do *mRNA* e da expressão proteína do GLUT2. Tais achados já foram apontados em ratos ZDF e outros modelos de DM2, incluindo o rato GK e o camundongo *db/db*, além de humanos (CHEN et al., 1990; FERRER et al., 1995). Nossos resultados indicaram diminuída expressão do GLUT2 e prejudicada GSIS nas ilhotas dos animais HFDS, comparado apenas ao grupo HFDSTR como descrito em outros estudos (BONNY et al., 1997; ORCI et al., 1990). Ao contrário do que tem sido descrito na literatura (CERF, 2007; REIMER; AHRÉN, 2002), a expressão do GLUT2 não se modificou com a dieta utilizada.

CALEGARI et al. (2011) mostraram aumento na expressão dessa proteína GLUT2, seguido da redução na GSIS em ilhotas de ratos alimentados com dieta padrão, após oito semanas de corrida em esteira. De outro modo, a expressão do GLUT2 diminuiu nas ilhotas pancreáticas dos animais CTR apenas quando comparado aos HFDSTR, sem alteração da GSIS. UEDA et al. (2003) mostraram redução tanto da atividade glicoquinase como na expressão do GLUT2 na ilhotas de ratos treinados por 9 semanas e alimentados com dieta controle. Uma vez que o GLUT2 tem um papel crucial nas etapas iniciais da GSIS, a sua expressão, encontrada aumentada nas ilhotas dos animais HFDSTR, pode ser um dos mecanismos modulados para manter a GSIS semelhante ao C, demanda essa, diferente das ilhotas dos animais CTR.

As ilhotas pancreáticas são altamente vascularizadas e, segundo DAI et al. (2013), as mudanças adaptativas referentes ao mecanismo compensatório de insulina indicam que a ilhota aumenta a oferta vascular por dilatação de vasos pré-existent durante a resistência à insulina. Como consequência, a resistência à insulina conduz ao aumento da expressão de eNOS, uma enzima limitante para a síntese de NO. Por sua vez, o NO pode desempenhar um papel chave na regulação da vasodilatação dependente do endotélio (ALBRECHT et al., 2003). Mas, por outro lado altas concentrações de NO

também podem desempenhar efeitos pró-apoptóticos. Ao agir como uma espécie reativa de nitrogênio, NO pode danificar as células β através da formação de conjugados de nitrotirosina. Similar ao papel de ROS, o NO também pode modular a GSIS e atividades anti e pró-apoptóticas, à depender de suas concentrações. Produção exagerada de NO pela isoforma iNOS foi descrita nas ilhotas pancreáticas de ratos GK e em modelos de obesidade induzida por dieta, resultando em GSIS diminuída (MOSÉN et al., 2008). No presente estudo, não obteve-se sucesso em mensurar a expressão da iNOS no homeogenato das ilhotas pancreáticas dos 4 grupos estudados e a expressão da e-NOS, também relacionada com ações antiapoptóticas e reguladoras da GSIS, não diferiu entre os grupos.

Ademais, a atividade da enzima arginase, variável que compete com a óxido nítrico sintase pela utilização do mesmo substrato para a síntese de NO, foi maior nas ilhotas pancreáticas do grupo C comparado ao grupo CTR e HFDS. Sugere-se que as ilhotas dos animais C produziram, portanto, menos NO e, possivelmente, maior o desvio de L-arginina para a formação de L-ornitina e uréia. Do contrário, a baixa atividade da arginase nas ilhotas pancreáticas no grupo CTR está relacionada aos achados em outros tecidos em que o treinamento crônico aumentou a produção de NO tanto em humanos como em modelo animal saudável (KOTSIURUBA et al., 2012). Alterações na disponibilidade e sinalização de NO desempenham um papel crucial nos primeiros estágios da síndrome metabólica (HERMIER et al., 2016). No que diz respeito à menor atividade da arginase nas ilhotas dos animais HFDS, sugerimos que seja uma modulação no sentido de garantir a produção de NO, à partir da via da óxido nítrico sintase. É importante destacar que não há como inferir uma conclusão à respeito da participação do NO no modelo estudado, uma vez que não dispomos das medidas de produção/quantificação de NO, atividade da óxido nítrico sintase e outras variáveis como as isoformas nas enzimas iNO, nNOS, etc.

Limitações do estudo

É importante ressaltar que um ponto à desejar do nosso estudo é a ausência de resultados referentes à :

1-Calorimetria

2-Outros métodos de investigação que avaliem a progressão do mecanismo compensatório de insulina pelas células β .

3-Atividade e expressão protéica e/ou gênica das enzimas SOD, GSH e catalase para melhor discutir sobre a defesa antioxidante das ilhotas pancreáticas.

4-Repetir os experimentos com a sonda *mitosox* para quantificação do conteúdo de etídio de origem não citoplasmática.

5-Investigação das vias de morte intracelulares: bax/bcl, caspase 3 clivada.

Ainda que existam limitações, os achados da presente investigação são inéditos e de grande relevância, inclusive do ponto de vista da medicina translacional, para a compreensão da funcionalidade das ilhotas pancreáticas.

5 CONCLUSAO

Esses achados sugerem que 30 minutos de corrida moderada em esteira podem trazer benefícios modestos sobre a regulação da glicose e sensibilidade à insulina mas, principalmente, para a manutenção da viabilidade das células das ilhotas pancreáticas, preservada GSIS e aumentada expressão da SOD1 e do GLUT2, especialmente quando uma dieta hipercalórica é consumida. Portanto, nossos dados sugerem que o treinamento moderado representa uma ferramenta preventiva eficaz para o impedimento da instalação dos sinais que levam à obesidade, RI e diabetes tipo 2, resultantes do estilo de vida ocidental.

Mais estudos são necessários para elucidar melhor os mecanismos envolvidos com a manutenção da viabilidade celular e expressão de marcadores apoptóticos sobre o pâncreas endócrino.

REFERÊNCIAS*

ABDUL-GHANI, M. A. et al. The shape of plasma glucose concentration curve during OGTT predicts future risk of type 2 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 26, n. 4, p. 280-286, May 2010. ISSN 1520-7560. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20503260> >.

ACHARYA, J. D.; GHASKADBI, S. S. Islets and their antioxidant defense. **Islets**, v. 2, n. 4, p. 225-235, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1938-2022. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21099317> >.

AIZAWA, T. et al. Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell. **Trends Pharmacol Sci**, v. 19, n. 12, p. 496-499, Dec 1998. ISSN 0165-6147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9871411> >.

AL-GOBLAN, A. S.; AL-ALFI, M. A.; KHAN, M. Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 7, p. 587-591, 2014. ISSN 1178-7007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25506234> >.

ALBRECHT, E. W. et al. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **J Pathol**, v. 199, n. 1, p. 8-17, Jan 2003. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12474221> >.

ALBRIGHT, A. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 7, p. 1345-1360, Jul 2000. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10912903> >.

ASSAAD, H. et al. Analysis of energy expenditure in diet-induced obese rats. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 19, p. 967-985, 2014. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24896330> >.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, Mar 1999. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029572> >.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BABU, D. A.; DEERING, T. G.; MIRMIRA, R. G. A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates islet development and function in the maintenance of glucose homeostasis. **Mol Genet Metab**, v. 92, n. 1-2, p. 43-55, 2007 Sep-Oct 2007. ISSN 1096-7192. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17659992> >.

BELL, G. I. et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, n. 3, p. 198-208, Mar 1990. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2407475> >.

BINDOKAS, V. P. et al. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. **J Biol Chem**, v. 278, n. 11, p. 9796-9801, Mar 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514170> >.

BOCCATONDA, A. et al. Oxidative Stress Modulation Through Habitual Physical Activity. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 24, p. 3648-3680, 2016. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27072166> >.

BONORA, E. et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 57-63, Jan 2000. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10857969> >.

BOSLEM, E. et al. Alteration of endoplasmic reticulum lipid rafts contributes to lipotoxicity in pancreatic β -cells. **J Biol Chem**, Jul 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897822> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRITES, F. D. et al. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. **Clin Sci (Lond)**, v. 96, n. 4, p. 381-385, Apr 1999. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087245> >.

CALEGARI, V. C. et al. Endurance training stimulates growth and survival pathways and the redox balance in rat pancreatic islets. **J Appl Physiol**, v. 112,

n. 5, p. 711-718, Mar 2012. ISSN 1522-1601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174407> >.

_____. Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. **J Endocrinol**, v. 208, n. 3, p. 257-264, Mar 2011. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212094> >.

CAPITO, K. et al. Fat-induced changes in mouse pancreatic islet insulin secretion, insulin biosynthesis and glucose metabolism. **Acta Diabetol**, v. 28, n. 3-4, p. 193-198, 1992. ISSN 0940-5429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1576354> >.

CARPINELLI, A. R.; CURI, R.; MALAISSE, W. J. Long-term regulation of pancreatic B-cell responsiveness to D-glucose by food availability, feeding schedule, and diet composition. **Physiol Behav**, v. 52, n. 6, p. 1193-1196, Dec 1992. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1484879> >.

CARPINELLI, A. R. et al. Insulin secretion induced by palmitate--a process fully dependent on glucose concentration. **Diabetes Metab**, v. 28, n. 6 Pt 2, p. 3S37-3S44; discussion 3S108-12, Dec 2002. ISSN 1262-3636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12688632> >.

CAUMO, A.; LUZI, L. First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 287, n. 3, p. E371-E385, Sep 2004. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308473> >.

CERF, M. E. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. **Med Sci Monit**, v. 13, n. 1, p. RA12-RA17, Jan 2007. ISSN 1234-1010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179917> >.

_____. High fat programming of beta-cell failure. **Adv Exp Med Biol**, v. 654, p. 77-89, 2010. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20217495> >.

CHEN, G. C. et al. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. **Metabolism**, v. 60, n. 2, p. 155-164, Feb 2011. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045537> >.

CHEN, L. et al. Regulation of beta-cell glucose transporter gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 11, p. 4088-4092, Jun 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2190214> >.

CHURCH, T. Exercise in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 53, n. 6, p. 412-418, 2011 May-Jun 2011. ISSN 1532-8643. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21545927> >.

CNOP, M. et al. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1771-1777, Aug 2001. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11473037> >.

COLAK, Y. et al. SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Med Sci Monit**, v. 17, n. 5, p. HY5-HY9, May 2011. ISSN 1643-3750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525818> >.

COLBERG, S. R. et al. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement executive summary. **Diabetes Care**, v. 33, n. 12, p. 2692-2696, Dec 2010. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115771> >.

COLVILLE, C. A. et al. Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. **Biochem J**, v. 290 (Pt 3), p. 701-706, Mar 1993. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8457197> >.

CORDAIN, L. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr**, v. 81, n. 2, p. 341-354, Feb 2005. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15699220> >.

CORRALIZA, I. M. et al. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **J Immunol Methods**, v. 174, n. 1-2, p. 231-235, Sep 1994. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8083527> >.

DA LUZ, G. et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 9, p. 2015-2023, Sep 2011. ISSN 1439-6327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21249392> >.

DAI, C. et al. Pancreatic islet vasculature adapts to insulin resistance through dilation and not angiogenesis. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4144-4153, Dec 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23630302> >.

DALLECK, L. C. et al. A community-based exercise intervention transitions metabolically abnormal obese adults to a metabolically healthy obese phenotype. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 7, p. 369-380, 2014. ISSN 1178-7007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25120373> >.

DEENEY, J. T. et al. Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). **J Biol Chem**, v. 275, n. 13, p. 9363-9368, Mar 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734079> >.

DHAYAL, S.; WELTERS, H. J.; MORGAN, N. G. Structural requirements for the cytoprotective actions of mono-unsaturated fatty acids in the pancreatic beta-cell line, BRIN-BD11. **Br J Pharmacol**, v. 153, n. 8, p. 1718-1727, Apr 2008. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18297101> >.

DONE, A. J. et al. Exercise-induced Nrf2-signaling is impaired in aging. **Free Radic Biol Med**, v. 96, p. 130-138, Jul 2016. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27109910> >.

DUBOIS, M. et al. Non-esterified fatty acids are deleterious for human pancreatic islet function at physiological glucose concentration. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 463-469, Mar 2004. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14968298> >.

EMAMI, S. R. et al. Impact of eight weeks endurance training on biochemical parameters and obesity-induced oxidative stress in high fat diet-fed rats. **J Exerc Nutrition Biochem**, v. 20, n. 1, p. 29-35, Mar 2016. ISSN 2233-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27298810> >.

ERIKSSON, J. et al. Prevention of Type II diabetes in subjects with impaired glucose tolerance: the Diabetes Prevention Study (DPS) in Finland. Study design and 1-year interim report on the feasibility of the lifestyle intervention programme. **Diabetologia**, v. 42, n. 7, p. 793-801, Jul 1999. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10440120> >.

EVANS, C. C. et al. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p.

e92193, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670791> >.

EVANS, J. L. et al. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 1-8, Jan 2003. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502486> >.

FALONE, S. et al. Late-onset running biphasically improves redox balance, energy- and methylglyoxal-related status, as well as SIRT1 expression in mouse hippocampus. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e48334, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23110231> >.

FARIAS, J. M. et al. Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adipoR1-2/APPL1 protein levels in mice. **Lipids Health Dis**, v. 11, p. 134, 2012. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046739> >.

FERRER, J.; BENITO, C.; GOMIS, R. Pancreatic islet GLUT2 glucose transporter mRNA and protein expression in humans with and without NIDDM. **Diabetes**, v. 44, n. 12, p. 1369-1374, Dec 1995. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7589840> >.

FINKEL, T. Oxygen radicals and signaling. **Curr Opin Cell Biol**, v. 10, n. 2, p. 248-253, Apr 1998. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9561849> >.

_____. Oxidant signals and oxidative stress. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 2, p. 247-254, Apr 2003. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648682> >.

GARBER, C. E. et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 7, p. 1334-1359, Jul 2011. ISSN 1530-0315. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21694556> >.

GEHRMANN, W.; ELSNER, M.; LENZEN, S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β -cells. **Diabetes Obes Metab**, v. 12 Suppl 2, p. 149-158, Oct 2010. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029312> >.

GONZÁLEZ, J. A.; REIMANN, F.; BURDAKOV, D. Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurones. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 1, p. 41-48, Jan 2009. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981030> >.

GRACIANO, M. F. et al. Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets. **Islets**, v. 3, n. 5, p. 213-223, 2011 Sep-Oct 2011. ISSN 1938-2022. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750413> >.

GRAVENA, C.; MATHIAS, P. C.; ASHCROFT, S. J. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. **J Endocrinol**, v. 173, n. 1, p. 73-80, Apr 2002. ISSN 0022-0795. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927386> >.

HABER, E. P. et al. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic beta-cells. **J Cell Physiol**, v. 194, n. 1, p. 1-12, Jan 2003. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447984> >.

HAUBOLD, K. W. et al. Loss of desmin leads to impaired voluntary wheel running and treadmill exercise performance. **J Appl Physiol (1985)**, v. 95, n. 4, p. 1617-1622, Oct 2003. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12844497> >.

HERMIER, D. et al. NO synthesis from arginine is favored by α -linolenic acid in mice fed a high-fat diet. **Amino Acids**, May 2016. ISSN 1438-2199. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27178023> >.

HU, F. B. et al. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. **N Engl J Med**, v. 345, n. 11, p. 790-797, Sep 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556298> >.

HUSSAIN, K. Mutations in pancreatic β -cell Glucokinase as a cause of hyperinsulinaemic hypoglycaemia and neonatal diabetes mellitus. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 11, n. 3, p. 179-183, Sep 2010. ISSN 1573-2606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20878480> >.

IDO, Y. Diabetic complications within the context of aging: Nicotinamide adenine dinucleotide redox, insulin C-peptide, sirtuin 1-liver kinase B1-adenosine monophosphate-activated protein kinase positive feedback and forkhead box O3. **J Diabetes Investig**, v. 7, n. 4, p. 448-458, Jul 2016. ISSN 2040-1124. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27181414> >.

JITRAPAKDEE, S. et al. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. **Diabetologia**, v. 53, n. 6, p. 1019-1032, Jun 2010. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225132> >.

JORDY, A. B. et al. Analysis of the liver lipidome reveals insights into the protective effect of exercise on high-fat diet-induced hepatosteatosis in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 9, p. E778-E791, May 2015. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714675> >.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1068-1083, Mar 2014. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24315620> >.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, Dec 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167471> >.

KARPE, F.; DICKMANN, J. R.; FRAYN, K. N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2441-2449, Oct 2011. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948998> >.

KIRÁLY, M. A. et al. Swim training prevents hyperglycemia in ZDF rats: mechanisms involved in the partial maintenance of beta-cell function. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 2, p. E271-E283, Feb 2008. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029442> >.

KLEEMANN, R. et al. Time-resolved and tissue-specific systems analysis of the pathogenesis of insulin resistance. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8817, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20098690> >.

KOMATSU, M. et al. Glucose stimulation of insulin release in the absence of extracellular Ca²⁺ and in the absence of any increase in intracellular Ca²⁺ in rat pancreatic islets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 23, p. 10728-10732, Nov 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479873> >.

KOTSIURUBA, A. V. et al. [Arginase-nitric oxide synthase system changes due to adaptation to swimming in adult and aged rat hearts]. **Fiziol Zh**, v. 58, n. 1, p. 27-35, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22590735> >.

LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v. 16, n. 1, p. 35-39, Jan 1967. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5333500> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LAMONTAGNE, J. et al. Circulating lipids are lowered but pancreatic islet lipid metabolism and insulin secretion are unaltered in exercise-trained female rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 32, n. 2, p. 241-248, Apr 2007. ISSN 1715-5312. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486165> >.

LAYCHOCK, S. G. Glucose metabolism, second messengers and insulin secretion. **Life Sci**, v. 47, n. 25, p. 2307-2316, 1990. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2175823> >.

LEI, X. G.; VATAMANIUK, M. Z. Two tales of antioxidant enzymes on β cells and diabetes. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 3, p. 489-503, Feb 2011. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618069> >.

LELOUP, C. et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 673-681, Mar 2009. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19073765> >.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radic Biol Med**, v. 20, n. 3, p. 463-466, 1996. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8720919> >.

LERMAN, I. et al. Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. **J Appl Physiol (1985)**, v. 92, n. 6, p. 2245-2255, Jun 2002. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015333> >.

LETURQUE, A.; BROU-LAROCHE, E.; LE GALL, M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E985-E992, May 2009. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223655> >.

LEVIN, B. E.; TRISCARI, J.; SULLIVAN, A. C. Metabolic features of diet-induced obesity without hyperphagia in young rats. **Am J Physiol**, v. 251, n. 3

Pt 2, p. R433-40, Sep 1986. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3529988> >.

LINGOHR, M. K.; BUETTNER, R.; RHODES, C. J. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? **Trends Mol Med**, v. 8, n. 8, p. 375-384, Aug 2002. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12127723> >.

MACDONALD, M. J. et al. Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 1, p. E1-15, Jan 2005. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585595> >.

MALIK, V. S. et al. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 33, n. 11, p. 2477-2483, Nov 2010. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20693348> >.

MARGARITIS, I. et al. No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. **Int J Sports Med**, v. 18, n. 3, p. 186-190, Apr 1997. ISSN 0172-4622. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187972> >.

MONTGOMERY, M. K. et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. **Diabetologia**, v. 56, n. 5, p. 1129-1139, May 2013. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23423668> >.

MORGAN, C. R.; LAZAROW, A. Immunoassay of insulin using a two-antibody system. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 110, p. 29-32, May 1962. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14475952> >.

MORGAN, D. et al. Association of NAD(P)H oxidase with glucose-induced insulin secretion by pancreatic beta-cells. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2197-2201, May 2009. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147679> >.

MOSÉN, H. et al. Impaired glucose-stimulated insulin secretion in the GK rat is associated with abnormalities in islet nitric oxide production. **Regul Pept**, v. 151, n. 1-3, p. 139-146, Nov 2008. ISSN 0167-0115. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18662725> >.

MULDER, H. et al. Differential changes in islet amyloid polypeptide (amylin) and insulin mRNA expression after high-fat diet-induced insulin resistance in

C57BL/6J mice. **Metabolism**, v. 49, n. 12, p. 1518-1522, Dec 2000. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145110> >.

MUSCOGIURI, G. et al. Genetic disruption of SOD1 gene causes glucose intolerance and impairs β -cell function. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4201-4207, Dec 2013. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009256> >.

NEWSHOLME, P. et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **J Physiol**, v. 583, n. Pt 1, p. 9-24, Aug 2007. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17584843> >.

_____. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function: a critical role for amino acids. **J Endocrinol**, v. 214, n. 1, p. 11-20, Jul 2012. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22547566> >.

NOLAN, C. J. et al. Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. **Diabetologia**, v. 49, n. 9, p. 2120-2130, Sep 2006. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16868750> >.

NUNES, V. A. et al. Progesterone induces apoptosis of insulin-secreting cells: insights into the molecular mechanism. **J Endocrinol**, v. 221, n. 2, p. 273-284, May 2014. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24594616> >.

OLIVEIRA, H. R.; CURI, R.; CARPINELLI, A. R. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. **Am J Physiol**, v. 276, n. 2 Pt 1, p. C507-C510, Feb 1999. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9950779> >.

OLIVEIRA, H. R. et al. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. **Diabetes**, v. 52, n. 6, p. 1457-1463, Jun 2003. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765957> >.

OPARA, E. C. et al. Effect of fatty acids on insulin release: role of chain length and degree of unsaturation. **Am J Physiol**, v. 266, n. 4 Pt 1, p. E635-E639, Apr 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8178984> >.

ORCI, L. et al. Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia.

Proc Natl Acad Sci U S A, v. 87, n. 24, p. 9953-9957, Dec 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2263645> >.

OTERO-LOSADA, M. et al. Exercise Ameliorates Endocrine Pancreas Damage Induced by Chronic Cola Drinking in Rats. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155630, 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27192084> >.

PARK, S. Y. et al. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3530-3540, Dec 2005. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16306372> >.

PAULA, F. M. et al. Exercise increases pancreatic β -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. **FASEB J**, v. 29, n. 5, p. 1805-1816, May 2015. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609426> >.

PI, J.; COLLINS, S. Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic β -cell function. **Diabetes Obes Metab**, v. 12 Suppl 2, p. 141-148, Oct 2010. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029311> >.

PI, J. et al. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 244, n. 1, p. 77-83, Apr 2010. ISSN 1096-0333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501608> >.

PICINATO, M. C. et al. Soybean- and olive-oils-enriched diets increase insulin secretion to glucose stimulus in isolated pancreatic rat islets. **Physiol Behav**, v. 65, n. 2, p. 289-294, Nov 1998. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9855478> >.

PICK, A. et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. **Diabetes**, v. 47, n. 3, p. 358-364, Mar 1998. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519740> >.

PITHON-CURI, T. C. et al. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. **Clin Sci (Lond)**, v. 103, n. 4, p. 403-408, Oct 2002. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12241540> >.

PLÖTZ, T. et al. The role of lipid droplet formation in the protection of unsaturated fatty acids against palmitic acid induced lipotoxicity to rat insulin-producing cells. **Nutr Metab (Lond)**, v. 13, p. 16, 2016. ISSN 1743-7075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918025> >.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, Oct 2008. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923182> >.

POWERS, S. K.; NELSON, W. B.; HUDSON, M. B. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 942-950, Sep 2011. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167935> >.

PRADA, P. O. et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1576-1587, Mar 2005. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591151> >.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 153-159, Jan 2008. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191751> >.

RAZA, H. et al. Exercise-induced alterations in pancreatic oxidative stress and mitochondrial function in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **Physiol Rep**, v. 4, n. 8, Apr 2016. ISSN 2051-817X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27095835> >.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr**, v. 127, n. 5 Suppl, p. 838S-841S, May 1997. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164249> >.

REIMER, M. K.; AHRÉN, B. Altered beta-cell distribution of pdx-1 and GLUT-2 after a short-term challenge with a high-fat diet in C57BL/6J mice. **Diabetes**, v. 51 Suppl 1, p. S138-S143, Feb 2002. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815473> >.

RIEBE, D. et al. Updating ACSM's Recommendations for Exercise Preparticipation Health Screening. **Med Sci Sports Exerc**, v. 47, n. 11, p. 2473-2479, Nov 2015. ISSN 1530-0315. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473759> >.

ROBERTSON, R. et al. Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in type 2 diabetes. **Cell Biochem Biophys**, v. 48, n. 2-3, p. 139-146, 2007. ISSN 1085-9195. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709883> >.

ROBERTSON, R. P. et al. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S119-S124, Feb 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749276> >.

_____. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. **J Clin Invest**, v. 90, n. 2, p. 320-325, Aug 1992. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644911> >.

ROTHMAN, J. E.; ORCI, L. Molecular dissection of the secretory pathway. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 409-415, Jan 1992. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1734280> >.

SABIN, M. A. et al. Fasting nonesterified fatty acid profiles in childhood and their relationship with adiposity, insulin sensitivity, and lipid levels. **Pediatrics**, v. 120, n. 6, p. e1426-e1433, Dec 2007. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055661> >.

SACHDEVA, M. M. et al. Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 45, p. 19090-19095, Nov 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855005> >.

SATO MITO, N. et al. Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice. **J Nutr Health Aging**, v. 13, n. 7, p. 602-606, Aug 2009. ISSN 1760-4788. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19621195> >.

SHIMABUKURO, M. et al. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 5, p. 2498-2502, Mar 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482914> >.

SRERE, P. A.; BHADURI, A. THE CITRATE CLEAVAGE ENZYME. III. CITRYL COENZYME A AS A SUBSTRATE AND THE STEREOSPECIFICITY OF THE ENZYME. **J Biol Chem**, v. 239, p. 714-718, Mar 1964. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14154442> >.

STAMATERIS, R. E. et al. Adaptive β -cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, n. 1, p. E149-E159, Jul 2013. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673159> >.

STEIN, D. T. et al. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. **J Clin Invest**, v. 97, n. 12, p. 2728-2735, Jun 1996. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675683> >.

_____. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. **J Clin Invest**, v. 100, n. 2, p. 398-403, Jul 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218517> >.

STRAUB, S. G. et al. Glucose activates both K(ATP) channel-dependent and K(ATP) channel-independent signaling pathways in human islets. **Diabetes**, v. 47, n. 5, p. 758-763, May 1998. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588447> >.

SUMIYOSHI, M.; SAKANAKA, M.; KIMURA, Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. **J Nutr**, v. 136, n. 3, p. 582-587, Mar 2006. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16484528> >.

TAGLE, M. A. Proteína: qualidade química e biológica, In: _____. Nutrição. São Paulo: Artes médicas, 1981. cap. 4, p. 49-65.

TANAKA, Y. et al. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 19, p. 12363-12368, Sep 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218186> >.

TEJEDO, J. et al. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells. **FEBS Lett**, v. 459, n. 2, p. 238-243, Oct 1999. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10518027> >.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, n. 6, p. L1005- L1028, Dec 2000. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076791> >.

THENT, Z. C.; DAS, S.; HENRY, L. J. Role of exercise in the management of diabetes mellitus: the global scenario. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80436, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24236181> >.

TIEDGE, M. et al. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1733-1742, Nov 1997. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9356019> >.

TSUBOI, T. et al. 5'-AMP-activated protein kinase controls insulin-containing secretory vesicle dynamics. **J Biol Chem**, v. 278, n. 52, p. 52042-52051, Dec 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532293> >.

TSUHAKE, M. H. et al. Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood-brain barrier, reducing viral load, and lessening inflammation. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 5, p. 704-712, Mar 2010. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20035861> >.

TURNER, N. et al. Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. **Diabetologia**, v. 56, n. 7, p. 1638-1648, Jul 2013. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23620060> >.

UEDA, H. et al. Enhanced expression of neuronal nitric oxide synthase in islets of exercise-trained rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 312, n. 3, p. 794-800, Dec 2003. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14680835> >.

VELUTHAKAL, R. et al. Ceramide induces mitochondrial abnormalities in insulin-secreting INS-1 cells: potential mechanisms underlying ceramide-mediated metabolic dysfunction of the beta cell. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 841-850, Aug 2005. ISSN 1360-8185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16133874> >.

VERAS, K. et al. DHEA supplementation in ovariectomized rats reduces impaired glucose-stimulated insulin secretion induced by a high-fat diet. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 141-146, 2014. ISSN 2211-5463. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24490138> >.

VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E1164- E1171, May 2009. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19276393> >.

VIOLLET, B. et al. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 14, p. 3380-3400, 2009. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273282> >.

WALI, J. A. et al. Measuring death of pancreatic beta cells in response to stress and cytotoxic T cells. **Methods Mol Biol**, v. 1292, p. 165-176, 2015. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25804755> >.

WELLS, J. C. An evolutionary perspective on the trans-generational basis of obesity. **Ann Hum Biol**, v. 38, n. 4, p. 400-409, Jul 2011. ISSN 1464-5033. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21599467> >.

WONG, C. K. et al. A high-fat diet rich in corn oil reduces spontaneous locomotor activity and induces insulin resistance in mice. **J Nutr Biochem**, v. 26, n. 4, p. 319-326, Apr 2015. ISSN 1873-4847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25555452> >.

AVMA *Guidelines on Euthanasia*, 2007. Disponível em: www.icb.usp.br/etica/euthanasia.pdf

Diabetes Trials Unit. HOMA Calculator. Disponível em: <https://www.dtu.ox.ac.uk>.

ZOPPI, C. C. et al. Exercise training enhances rat pancreatic islets anaplerotic enzymes content despite reduced insulin secretion. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 9, p. 2369-2374, Sep 2011. ISSN 1439-6327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21287194> >.

ANEXOS

Figura 1 –Área sob a curva da massa corporal dos grupos experimentais. *Dieta ($P < 0,001$); #treinamento ($P < 0,001$); ^aInteração entre HFDS vs demais grupos ($< 0,05$), ^bInteração entre HFDSTR vs CTR e HFDSTR vs HFDS ($P < 0,05$). $n = 20-31$.