

Bruno Pereira Melo

**EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA
SUPLEMENTAÇÃO DE FLAVANÓIS DO CACAU (*Theobroma cacao*) SOBRE O
DESEMPENHO FÍSICO, O METABOLISMO E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS
EM RATOS RESISTENTES À INSULINA**

Belo Horizonte
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional/UFMG
2020

Bruno Pereira Melo

**EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA
SUPLEMENTAÇÃO DE FLAVANÓIS DO CACAU (*Theobroma cacao*) SOBRE O
DESEMPENHO FÍSICO, O METABOLISMO E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS
EM RATOS RESISTENTES À INSULINA.**

Versão Final

Tese de doutorado apresentado à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, como requisito para a obtenção do título de doutor em Ciências do Esporte.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Danusa Dias Soares

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gleide F. de Avelar

Belo Horizonte
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional/UFMG
2020

M528e Melo, Bruno Pereira
2020 Efeitos agudos e crônicos do exercício físico e da suplementação de flavanóis do cacau (theobroma cacao) sobre o desempenho físico, o metabolismo e mediadores inflamatórios em ratos resistentes à insulina. [manuscrito]. / Bruno Pereira Melo – 2020.

157 f., enc.: il.

Orientadora: Danusa Dias Soares

Coorientadora: Gleide Fernandes de Avelar

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional.

Bibliografia: f. 91-108

1. Educação física - Teses. 2. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Teses. 3. Diabetes - Teses. I. Soares, Danusa Dias. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. III. Título.

CDU: 612:796

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Sheila M. Teixeira, CRB 6: n° 2106, da Biblioteca da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG.



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Bruno Pereira Melo

Às 14:00 horas do dia 4 de setembro de 2020, reuniu-se na Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO DE FLAVANÓIS DO CACAU (*Theobroma cacao*) SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO, O METABOLISMO E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM RATOS RESISTENTES À INSULINA”. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Danusa Dias Soares (UFMG), orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra para o candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Membro da Banca	Aprovado	Reprovado
Profa. Dra. Danusa Dias Soares (orientadora) – UFMG	X	
Profa. Dra. Gleide Fernandes de Avelar (coorientadora) – UFMG	X	
Prof. Dr. Samuel Penna Wanner - UFMG	X	
Profa. Dra. Etel Rocha Vieira - UFVJM	X	
Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira - UFMG	X	
Prof. Dr. Rodrigo Sudatti Delevatti - UFSC	X	

Após as indicações o candidato **foi considerado: APROVADO**

O resultado foi comunicado publicamente para o candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 4 de setembro de 2020.

Profa. Dra. Danusa Dias Soares (orientadora) – UFMG

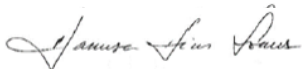
Profa. Gleide Fernandes de Avelar (coorientadora) – UFMG

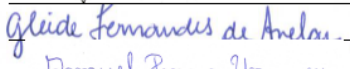
Prof. Dr. Samuel Penna Wanner – UFMG


Profa. Dra. Etel Rocha Vieira – UFVJM

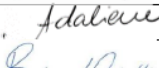
Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira – UFMG


Prof. Dr. Rodrigo Sudatti Delevatti – UFSC
















PARECER

Considerando que a Tese do discente **Bruno Pereira Melo**, intitulada **"EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO DE FLAVANÓIS DO CACAU (*Theobroma cacao*) SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO, O METABOLISMO E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM RATOS RESISTENTES À INSULINA"** **cumpriu** suas funções didáticas, **atendendo** a todos os critérios científicos, a Comissão Examinadora **aprovou** a defesa de Tese.

Profa. Dra. Danusa Dias Soares (orientadora) – UFMG

Profa. Dra. Gleide Fernandes de Avelar (coorientadora) – UFMG

Prof. Dr. Samuel Penna Wanner - UFMG

Profa. Dra. Etel Rocha Vieira - UFVJM

Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira - UFMG

Prof. Dr. Rodrigo Sudatti Delevatti - UFSC













Belo Horizonte, 4 de setembro de 2020.



A Tese intitulada "EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO DE FLAVANÓIS DO CACAU (*Theobroma cacao*) SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO, O METABOLISMO E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM RATOS RESISTENTES À INSULINA", de autoria do discente Bruno Pereira Melo, defendida em 4 de setembro de 2020, na Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais, foi submetida à banca examinadora composta pelos professores:

Profa. Dra. Danusa Dias Soares (orientadora)
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Gleide Fernandes de Avelar (coorientadora)
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Samuel Penna Wanner
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Etel Rocha Vieira
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Rodrigo Sudatti Delevatti
Universidade Federal do Santa Catarina

Belo Horizonte, 4 de setembro de 2020.

*A minha esposa Juliana,
A meus pais, Rubem e Cássia,
A minha irmã Camila,
A minha sobrinha Maria Fernanda!*

Dedico!!!!

AGRADECIMENTOS

De todos os parágrafos da tese, os descritos nesta seção são os mais importantes. A presente tese foi construída e realizada por meio da orientação, colaboração, apoio e incentivo de diversos professores, amigos e familiares. Portanto, tentarei descrever mesmo que por poucas palavras a minha tamanha gratidão por cada pessoa que contribuiu durante todo o processo de doutorado e realização deste trabalho, especialmente agradeço:

Aos meus pais Rubem e Cássia pelo amor incondicional! Obrigado pela oportunidade de estudar, aos conselhos verdadeiros e todo carinho. Agradeço-lhes imensamente, pois, apesar de todas as dificuldades que a vida lhes fizeram passar, jamais deixaram de me incentivar! Levarei sempre comigo a frase: “*não tivemos a oportunidade de estudar, mas faremos o que for preciso para que você e sua irmã tenham!* (CÁSSIA, MP., 2008)”. Saibam que cada gota de suor derramado na carpintaria e cada lágrima de saudade durante todos esses anos não foram em vão. Se hoje estou apresentando esta tese e defendendo o título de doutor é simplesmente por causa de vocês! Por isso, muito obrigado! Eu os amo!

A minha irmã Camila, que apesar da distância, sempre esteve ao meu lado durante todos esses anos. Obrigado k-k também por nos presentear com a nossa linda Maria Fernanda! Ela é o motivo principal que nos faz seguir em frente e nos unir cada dia mais! Obrigado por nunca ter faltado apoio, incentivo e amor!

A minha esposa Juliana pelo seu amor, companheirismo e incentivo! Agradeço por estar presente em todos os momentos e por sempre incentivar a continuar! Obrigado por sempre estar junto nas viagens e nas (inúmeras) mudanças! Obrigado por compreender as ausências e por diversas vezes, à distância. Agradeço imensamente por nunca ter faltado apoio e simplesmente por ser esta pessoa maravilhosa que a vida me presenteou!

A professora Dr^a Danusa Dias Soares pela confiança, oportunidade e orientação durante todos esses anos. Pelo exemplo de coerência, honestidade e humanidade! Agradeço por sempre compartilhar seus conhecimentos e experiências os quais enriqueceram imensuravelmente a minha formação. Agradeço também por proporcionar a realização de um sonho (o estágio sanduíche na Université de Lille, França), o que para muitos conhecer o continente europeu seja “normal”, para mim devido às condições, a única oportunidade seria por meio dos estudos. Obrigado professora por sempre compreender as minhas limitações e orientar sempre o melhor caminho. Cada conversa/reunião foi e será sempre um aprendizado não apenas acadêmico, mas também para a vida. Por fim, não poderia deixar de agradecer-lhe a relação de amizade e confiança construída durante o doutoramento, isto proporcionou que o processo fosse o mais motivante e prazeroso possível. Por isso professora, saiba que não somente eu, mas todos de minha família somos amplamente gratos por tudo que fizestes! Muito obrigado professora!

A professora Dr^a Gleide F. de Avelar pela confiança, oportunidade e orientação durante todos esses anos. Agradeço pelas inúmeras conversas/reuniões produtivas e enriquecedoras que contribuíram efetivamente em minha formação acadêmica. Agradeço por proporcionar o aprendizado das análises histomorfométricas e imunohistoquímica que nos permitiu não apenas avançar nas respostas apresentadas na presente tese, mas também concretizar novas parcerias e projetos relacionados ao exercício físico. Obrigado Gleide por todos os ensinamentos, pelo exemplo de coerência e dedicação! Espero que esta parceria continue por muitos e muitos anos! Muito obrigado professora!

Ao professor Dr. Samuel Penna Wanner por todos os ensinamentos, pela disponibilidade, esclarecimentos e orientação. Obrigado Samu pelas colaborações com o projeto e por todas as sugestões na qualificação do mesmo. Agradeço também a confiança e a oportunidade de trabalhar em conjunto em diferentes projetos ao longo do doutorado. Por fim, não poderia deixar de agradecer por todas as assistências e (mesmo que em momentos raros), por sempre salvar nosso time todas as vezes que eu errava o passe e/ou o gol (risos) no futebol de segunda-feira. Muito obrigado Samu!

Special thanks to professor Elsa Heyman! Thank you Elsa for contributing effectively to my academic career! Thank you for all your attention and receptivity! I appreciate the partnership and the opportunity to work together on research projects. Thank you for contributing to the realization of a dream! You, Tom, Joan, and all your family will always be remembered and will be part of our family here in Brazil! Thank you for the knowledge of a new sport (climbing)! Thank you for each class and the invitation to participate in the competitions! Already included in my curriculum the participation in the international climbing competition (☺)! Thank you for all of our “Scientific meetings during running”! Despite a short time, it was one of the happiest periods of my life! I hope we can continue working together for many, many years! Thanks, Elsa for so much affection!

To professors Sergie Berthoin, Frederic Daussin, Semah Tagougui, and Samir Bensaid from Université de Lille and all professors, technicians, and employees of the EURASPORT group for all attention, familiarity, and receptivity! Thanks for the knowledge and opportunity to work together! It was a pleasure to work together and be able to be part of this magnificent group! I’m grateful to the MOBILLEX program from Université de Lille for the scholarship that allowed the internship at Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société (URePSSS)!

To my dear friends Lucile Vanneste (Lu) and Elodie Lespagnol! Thanks for sharing all knowledge about micro and macrocirculation assessment (NIRS, Flow-mediated dilatation, laser speckle imaging, etc...) and the opportunity to work together! Thanks for all receptivity, for the French classes and for the partnership in the climbing training! I will continue training to one day reach yours climbing level! I’m honored to have you as my friends! Thanks for all help without hesitation! I hope one day to receive you in Brazil and return such gratitude for everything you have done!

A professora Dr^a Letícia M. Cordeiro pelos ensinamentos, auxílio e orientação nos procedimentos experimentais da tese. Obrigado Lê por toda atenção e disponibilidade! Agradeço também pela oportunidade de trabalhar em conjunto em diferentes projetos e por todo incentivo durante o doutorado! Muito obrigado Lê!

A Joyce e Aline (Alinex) por toda a ajuda na realização dos estudos da tese. Agradeço pela confiança, comprometimento e a convivência durante todos esses anos. Agradeço também pelas boas histórias e risadas no BK e nas feijoadas de sextas-feiras (sempre no “bandejão”!). Obrigado pela tamanha dedicação!

A professora Dr^a Adaliene Versiani Matos Ferreira e a professora Dr^a. Etel Rocha Vieira por toda a atenção, disponibilidade e por todas as sugestões durante a qualificação! Sem dúvida, as mesmas enriqueceram e muito a construção do projeto da tese;

As alunas do Laboratório de Imunometabolismo Josiane (Josi) e Amanda (Amandinha) por toda ajuda na preparação das amostras e dosagens de Elisa e por sempre estarem dispostas a auxiliar no que fosse preciso;

As técnicas dos laboratórios Mara Livia e Maira por todo auxílio e colaboração na organização, nos procedimentos experimentais e também nas análises laboratoriais;

As professoras Dr^a Maristela de Oliveira Poletini, Dr^a Nayara Horta (Nay), Dr^a Tais Santana e Paola Fernandes por todos os ensinamentos e ajuda na realização do PCR. Obrigado pela convivência e também pelas boas risadas.

Aos amigos do Lafise Igor Tinoco (Tim), João Gabriel (Jhones), Eduardo (Dudu), André (Bob), Alexandre (Alex), Camila (Berbert), Patrícia Rabelo (Paty), pela convivência, amizade, por todas as contribuições e ajuda durante todos esses anos;

Aos funcionários da EEEFTO especialmente aos porteiros Marcos, Sr. Antônio, Edvaldo e Sr. Paulo pelas conversas e ensinamentos da vida inclusive nos finais de semana os quais haviam experimentos no laboratório;

Aos amigos Ramon Cruz, Francisco de Assis Manoel e Cristóvão A. R. S. Vilela por estarem presentes em todos os momentos, pelo companheirismo, convivência, pelas contribuições e por todos os ensinamentos construídos ao longo desses anos.

Ao professor Fernando R. de Oliveira (*in memoriam*) o responsável por mudar a minha trajetória acadêmica! Obrigado por todos os conselhos e pela simples frase “...*Talvez, em nenhum outro momento de sua vida, você conseguirá se dedicar aos estudos do que agora, aproveite a Universidade Federal!*... (De Oliveira, 2008). Me fizeste acreditar que a dedicação aos estudos valeria a pena. E como sempre, estava correto! Obrigado por todos os ensinamentos não apenas acadêmicos, mas para a vida! Agradeço pela oportunidade de participar e vivenciar um dos projetos mais fantásticos que já conheci, o CRIA Lavras! Agradeço imensuravelmente à Raquel (esposa), Pedro e Vitor (filhos) por dividir este “paizão” e professor conosco durante todos estes anos. Sua história e seu legado ficará sempre em meu coração e será transmitido em cada sala de aula que lecionarei!

E a todos os demais amigos, professores e familiares que mesmo não citados aqui, contribuíram efetivamente para que não apenas a tese, mas toda a trajetória acadêmica fosse possível de ser concretizada.

A todos vocês,

Muito obrigado!!!

*“Somente à educação com qualidade é capaz de nos tornar sábios.
A sabedoria nos transforma em humanos melhores e torna o mundo mais justo.
Ser sábio, portanto, deverá ser sempre um direito de todos!”*

Bruno P. Melo (2020)

RESUMO

O diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) é uma doença multifatorial caracterizada pela hiperglicemia crônica. O consumo de dietas hipercalóricas associado ao sedentarismo são fatores contribuintes para o aumento da prevalência de obesidade e DM2 na população mundial. Embora o consumo de flavanóis do cacau (CF) esteja associado a diversos benefícios para a saúde, os seus efeitos combinados ao exercício aeróbico (EXE) sobre o metabolismo e estado inflamatório, em condições de resistência à insulina (IR) ainda são desconhecidos. O objetivo da tese foi verificar os efeitos agudos e crônicos do EXE e da suplementação de CF sobre o desempenho aeróbico, sobre o metabolismo e mediadores inflamatórios em ratos IR. Os estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG, protocolo nº. 110/2016). Ratos Wistar machos (250 ± 10 g) foram submetidos a um protocolo de indução de IR por meio de dieta hiperlipídica e bebida rica em frutose de forma combinada durante 30 dias. Os ratos controles (CON) permaneceram com dieta padrão pelo mesmo período de tempo. No estudo 1, após a indução da IR, os ratos CON e IR foram suplementados agudamente com solução de CF (45 mg kg^{-1} de massa corporal) ou solução placebo (PLA) e submetidos à uma sessão aguda de corrida em esteira ($60\% \text{ VO}_{2\text{pico}}$) (EXE) ou permaneceram em repouso (REST) por 30 minutos. Os ratos foram eutanasiados 30 minutos após a sessão experimental. No estudo 2, a intervenção com PLA ou CF combinada ao REST ou EXE nos ratos IR foi realizada uma vez ao dia, cinco dias por semana durante oito semanas. Os ratos foram eutanasiados 48h após a última sessão de intervenção, em jejum de 6 hora. A suplementação aguda de CF atenuou a hiperglicemia dos ratos IR após o exercício aeróbio submáximo ($p < 0,001$) promovendo efeitos aditivos aos do EXE na fosforilação da proteína Akt (pAkt) no fígado dos ratos IR. O EXE e CF *per si* também aumentaram fosforilação da proteína AMPK (pAMPK) no fígado ($p < 0,001$) e no músculo esquelético ($p < 0,001$), reduziram a expressão de TRB3 ($p < 0,01$) e aumentaram a expressão de CPT-1 α ($p < 0,001$) no fígado dos ratos IR. Cronicamente, a suplementação de CF e o EXE *per si* melhoraram o quadro de intolerância à glicose e o perfil lipídico, reduziram as concentrações de leptina ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), glicose ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), insulina ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e o índice HOMA ($p < 0,001$ e $p < 0,001$). Além disso, melhoraram o perfil inflamatório nos tecidos estudados. Quando combinadas, as intervenções induziram aumento de GLUT4 no músculo esquelético em maior magnitude ($p < 0,001$) quando comparadas às intervenções *per si*. Portanto, o exercício aeróbico e a suplementação de flavanóis do cacau induziram alterações no metabolismo, no perfil inflamatório e na expressão de proteínas chaves para o tratamento e prevenção da IR, sugerindo que a combinação de ambas as intervenções pode contribuir efetivamente na atenuação das complicações metabólicas decorrentes do DM2.

Palavras-chave: Diabetes do tipo 2. Citocinas. GLUT4. Polifenóis. Treinamento físico.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a multifactorial disease characterized by chronic hyperglycemia. The consumption of hypercaloric diets associated with a sedentary lifestyle has been responsible to increase the prevalence of obesity and DM2 in the world population. Although the consumption of cocoa flavanols (CF) is associated with several health benefits, its combined effects with aerobic exercise (EXE) in conditions of insulin resistance (IR) are still unknown. The objective this thesis was to verify the acute and chronic effects of EXE and CF supplementation on aerobic performance, metabolism and inflammatory markers in IR rats. The studies were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UFMG, protocol No. 110/2016). Male Wistar rats ($250 \pm 10\text{g}$) were submitted an insulin resistance induction protocol through a high-fat diet and a high-fructose beverage in combination for 30 days, control rats (CON) remained on standard rodent diet for the same period of time. In study 1, after the induction of IR, the CON and IR rats were supplemented with CF ($45\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of body mass) or placebo solution (PLA) and submitted to running on a treadmill ($60\% \text{VO}_2\text{peak}$) or remained at rest (REST) for 30 minutes. The rats were euthanized 30 minutes after the experimental session. In study 2, the intervention with PLA or CF combined with the REST or EXE in the IR rats was performed once a day, five days a week for eight weeks. The rats were euthanized 48h after the last 6-hour fasting intervention session. Acute CF supplementation attenuated hyperglycemia after submaximal aerobic exercise promoting additive effects to that of EXE on the phosphorylation of Akt protein in the liver of IR mice. EXE and CF also increased phosphorylation of the AMPK protein in the liver and skeletal muscle, reduced the expression of TRB3 and increased the expression of CPT-1 α ($p < 0.001$). Chronically, CF supplementation and EXE per se improved the condition of glucose intolerance and the lipid profile, reduced the concentrations of leptin, glucose, insulin and HOMA index ($p < 0.001$ and $p < 0.001$) and improved the inflammatory milieu in tissues studied. In addition, when both interventions were combined, the increase in GLUT4 in the skeletal muscle was greater when compared to the interventions per se. Therefore the present thesis demonstrated the efficacy of EXE and CF in improving key factors in the treatment and prevention of IR, suggesting that the combination of both interventions can effectively contribute to the reduction of metabolic complications resulting from DM2.

Keywords: Type 2 diabetes. Cytokines. GLUT4. Polyphenols. Physical training.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo 1.....	32
Figura 2 - Teste de tolerância oral à glicose (a), área sob a curva do OGTT (b), VO ₂ max (c), Vpeak (d) e TTE (e) após 30 dias de consumo da ração padrão para roedores (CON) ou dieta high-fat associada à ingestão de bebida rica em frutose (IR).....	37
Figura 3 - Efeitos agudos da suplementação dos flavanóis do cacau na concentração de glicose antes e após o exercício aeróbico submáximo.....	39
Figura 4 - Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e dos flavanóis do cacau sobre a concentração de glicose e insulina em ratos CON e IR.....	40
Figura 5 - Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e dos flavanóis do cacau na fosforilação de AKT e AMPK, na expressão gênica de TRB3 e CPT-1 α e nas citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no fígado de ratos CON e IR.....	42
Figura 6 - Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e dos flavanóis do cacau na fosforilação de AKT e AMPK, na expressão gênica de TRB3 e CPT-1 α e nas citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no músculo esquelético de ratos CON e IR.....	43
Figura 7 - Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e da suplementação dos flavanóis do cacau sobre as concentrações de citocinas no pâncreas.....	44
Figura 8 - Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e da suplementação dos flavanóis do cacau sobre as concentrações de citocinas no tecido adiposo.....	45
Figura 9 - Delineamento experimental estudo 2.....	61
Figura 10 - Teste de tolerância oral à glicose (OGTT) realizado antes e após o consumo de dieta high-fat e bebida rica em frutose.....	66
Figura 11 - Delta (Δ) da massa corporal (a), índice de adiposidade (b), concentração de adiponectina (c), leptina (d) e razão adiponectina / leptina (e) após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.....	67
Figura 12 - Teste de tolerância oral à glicose – OGTT (a) e área sob a curva (b) após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.....	68
Figura 13 - Concentração de glicose e insulina em jejum, índice HOMA e perfil lipídico após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.....	70

Figura 14 - Delta (Δ) do consumo pico de oxigênio (a), do tempo total de exercício (b) e da velocidade pico (c) obtidos durante a realização do teste incremental em esteira pré e após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.....	71
Figura 15 - Citocinas de ação pró e anti-inflamatórias nos hepatócitos dos ratos após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.....	72
Figura 16 - Expressão de GLUT4 e citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no músculo gastrocnêmio dos ratos após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.....	73
Figura 17 - Área das Ilhotas de Langerhans e citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no pâncreas dos ratos após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.....	74
Figura 18 - Área dos adipócitos e citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo epididimal dos ratos após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos primers utilizados no PCR quantitativo em tempo real.....	34
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrômetros
μm^2	Micrometros quadrados
ACC	Acetil CoA carboxilase
Akt	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
APPL1	Proteína adaptadora endosomal
AUC	Área sob a curva
BSA	Albumina do soro bovino
Ca^{2+}	Cálcio
CaMK	Proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina
CaN	Complexo Ca^{2+} /calmodulina
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CF	Flavanóis do cacau
COCOA	Cacau
CON	Controle
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1
C_T	Método comparativo do ciclo limiar
DAB	<i>3'3-diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate</i>
dL	Decilitros
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ECODIA	Exercício, Cacau, Cognição e Diabetes
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EXE	Exercício físico
FOXO	<i>Forkhead box class O protein</i>
FRT	Frutose
g	gramas
GLUT2	Transportador de glicose subfamília 2
GLUT4	Transportador de glicose subfamília 4
GSK3	Glicogênio sintase quinase-3
HbA1	Hemoglobina glicada
HDAC	<i>II histone deacetylase</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HFD	Dieta high-fat
HOMA-IR	Modelo de avaliação homeostática de resistência à insulina
ICAM	Moléculas de adesão intracelular

IKK β	Quinase do inibidor NF-kb
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IR	Resistência à insulina
IRS-1	Receptor do substrato da insulina
ITT	Teste de tolerância à insulina
JNK1/MAPK8	C-jun amino-terminal kinase 1
kcal	Quilocalorias
kg	Quilogramas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
m	Metros
MEF2	<i>Myocyte enhancer fator 2</i>
mg	Miligramas
min	Minutos
ml	Mililitros
NF-k β	Fator nuclear kappa β
ng	Nanograma
NO	Óxido nítrico
OGTT	Teste de tolerância oral à glicose
p38 MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno de 38kDa
pAkt	Proteína quinase B fosforilada
pAMPK	Proteína quinase ativada por AMP fosforilada
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
pg	Picograma
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinase
PLA	Placebo
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SED	Sedentários
SREBP1-c	Proteína 1c ligante no elemento regulador de esterol
STZ	Streptozotocina
T	Tempo percorrido do estágio incompleto
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAM	Tecido adiposo mesentérico
TAR	Tecido adiposo retroperitoneal
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRB3	<i>Mammalian homolog of Drosophila tribbles</i>
TTE	Tempo Total de Exercício
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Vel	Velocidade

VCAM	Molécula de adesão à célula vascular
VO ₂ peak	Consumo pico de oxigênio
Vpeak	Velocidade pico
Δ	Delta
mL	Microlitros
Π	pi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	20
1.1. Exercício físico e resistência à insulina.....	21
1.2. Suplementação de flavanóis e resistência à insulina.....	23
2. OBJETIVO GERAL DA TESE.....	26
3. <u>ESTUDO 1</u>: Efeitos agudos da suplementação dos flavanóis do cacau (<i>Theobroma cacao</i>) sobre as respostas metabólicas e inflamatórias associadas ao exercício submáximo em ratos resistentes à insulina.....	27
3.1. RESUMO.....	27
3.2. INTRODUÇÃO.....	28
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.3.1 Animais e Cuidados Éticos.....	30
3.3.2. Delineamento experimental.....	30
3.3.3. Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT).....	32
3.3.4. Suplementação de flavanóis do cacau e solução placebo.....	33
3.3.5. Familiarização a corrida e teste incremental em esteira.....	33
3.3.6. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	34
3.3.7. PCR quantitativo em tempo real para TRB3 e CPT-1 α	34
3.3.8. Análise Imunohistoquímica.....	35
3.3.9. Análise estatística.....	35
3.4. RESULTADOS.....	36
3.5. DISCUSSÃO.....	46
3.6. CONCLUSÕES.....	51
3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
4. <u>ESTUDO 2</u>: Efeitos do treinamento físico e da suplementação crônica de flavanóis do cacau (<i>Theobroma cacao</i>) sobre o desempenho físico, parâmetros metabólicos e sobre os mediadores inflamatórios e lipídico em ratos resistentes à insulina.....	58
4.1. RESUMO.....	58
4.2. INTRODUÇÃO.....	59
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.3.1. Animais e Cuidados Éticos.....	60
4.3.2. Delineamento experimental.....	60
4.3.3. Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT).....	62
4.3.4. Suplementação de flavanóis do cacau e solução placebo.....	62
4.3.5. Familiarização a corrida e teste incremental em esteira.....	63
4.3.6. Dosagens séricas.....	63
4.3.7. Índice de adiposidade.....	64
4.3.8. Citocinas pró e anti-inflamatórias: perfil inflamatório.....	64
4.3.9. Análises imunohistoquímica.....	64
4.3.10. Análises morfométricas.....	65
4.3.11. Análise estatística.....	65
4.4. RESULTADOS.....	66

4.5. DISCUSSÃO.....	76
4.6. CONCLUSÕES.....	81
4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
5. SÍNTESE DOS ARTIGOS E RELAÇÃO COM OS OBJETIVOS DA TESE.....	87
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE.....	91
APÊNDICE A – Resultados do estudo sobre os efeitos da administração de estreptozotocina (35mg·kg⁻¹ de massa corporal) após o consumo de dieta hiperlipídica por 30 dias em ratos Wistar.....	109
APÊNDICE B – Padronização do modelo de indução de resistência à insulina em ratos Wistar.....	112
APÊNDICE C - Original Article: Short-term combined consumption of high-fat-diet and fructose-rich beverage promotes insulin resistance and modulates inflammatory response and histomorphometry parameters of liver, pancreas and adipose tissue in Wistar rats.....	115
APÊNDICE D – Original Article: Acute intake of cocoa flavanols not change physical performance but attenuates the hyperglycemia after aerobic exercise in conditions of insulin resistance.....	135
APÊNDICE E – Concentração de catequina e epicatequina no plasma de ratos Wistar após a gavagem oral de solução com flavanóis do cacau (dose 45 mg·kg⁻¹ de massa corporal, NATUREX, Avignon, France).....	150
APÊNDICE F - Efeitos crônicos da suplementação dos flavanóis do cacau e do treinamento aeróbico sobre GLUT4 no músculo gastrocnêmio de ratos resistentes à insulina.....	151
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG).....	152
ANEXO B – Certificado de capacitação no uso e manejo de animais de laboratório.....	153
ANEXO C – Análise bromatológica da ração padrão.....	154
ANEXO D – Análise bromatológica da ração hiperlipídica.....	155

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O diabetes *mellitus* (DM) é considerado não apenas uma doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, que culminam no aumento da concentração de glicose (hiperglicemia) resultantes da deficiência na secreção de insulina (DM tipo 1) e/ou resistência à ação da mesma (DM tipo 2) (ALBERTI; ZIMMET, 1998; BRASIL, 2013; INZUCCHI *et al.*, 2015). Caracterizada como uma doença crônica multifatorial, diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento e a progressão do diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2), dentre eles, fatores genéticos, sobrepeso e/ou obesidade, insônia, além de fatores econômicos e psicossociais (HU, 2011).

Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016) apontam que aproximadamente 422 milhões de pessoas no mundo tenham diabetes. Somente no Brasil, estima-se que mais de 12 milhões de pessoas estejam em tratamento de DM e apesar da pré-disposição genética, o risco de desenvolvimento do DM tem aumentado em virtude do crescimento e envelhecimento populacional e da crescente prevalência de obesidade, consumo de dietas hipercalóricas e sedentarismo (BRASIL, 2013; DEFRONZO *et al.*, 2015).

O DM2 possui a maior frequência (90 a 95%) entre todos os casos de diagnósticos da doença, prevalecendo na população com idade entre 30 e 69 anos (DESHPANDE *et al.*, 2008; ADA, 2014; IDF, 2014). A diminuição da sensibilidade dos tecidos-alvos ao efeito metabólico da insulina é uma das características principais do DM2 que se caracteriza por quadro clínico de hiperglicemia crônica (ALBERTI; ZIMMET, 1998; ADA, 2014; INZUCCHI *et al.*, 2015).

Evidências têm mostrado que o quadro hiperglicêmico pode ocasionar diversas alterações metabólicas, incluindo disfunção mitocondrial e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (COHEN; TONG, 2010; SHENOUDA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015), diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (DE VRIESE *et al.*, 2000; OLOKOBA *et al.*, 2012), aumento na expressão de citocinas de ação pró-inflamatórias, tais como interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (LIN; SUN, 2010), aumentos na formação de produtos finais da glicação avançada (BARBOSA *et al.*, 2008), aumentos do tônus vascular e da permeabilidade das células endoteliais (STRATTON *et al.*, 2000; TABIT, *et al.*, 2010), que se não controladas e/ou revertidas, contribuem efetivamente para o surgimento de complicações micro e macrovasculares e doenças crônicas degenerativas (DEFRONZO *et al.*, 2015).

Embora a resistência hepática à insulina seja considerada um dos principais contribuintes da hiperglicemia de jejum no DM2 (MARINHO *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2017), a resistência à insulina podem ocorrer também em diversos tecidos, tais como, músculo esquelético (FERRANINI, 2010), tecido adiposo (GUILHERME *et al.*, 2008), rins (GERICH *et al.*, 2001), endotélio vascular (MEIJER *et al.*, 2012) e cérebro (BLÁZQUEZ *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram que a ativação de vias inflamatórias, incluindo, o complexo IKK β , c-jun amino-terminal kinase 1 (JNK1/MAPK8) e p38 MAPK pode levar à fosforilação do substrato do receptor de insulina em resíduos de serina, o que bloqueia a cascata de sinalização da insulina em diversos tecidos (De ALVARO *et al.*, 2004; ARKAN, *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que o TRB3 (*mammalian homolog of Drosophila tribbles*), um inibidor endógeno da proteína quinase B (Akt), possui um papel determinante na resistência hepática à insulina, o que bloqueia a ação da insulina no fígado ao se ligar à enzima Akt e reduzir sua fosforilação (MARINHO *et al.*, 2012).

Devido ao fato da resistência à insulina ser ocasionada em diversos tecidos por alterações fisiológicas anteriormente comentadas, diversas intervenções não medicamentosas tem demonstrado ser eficazes para atenuar as complicações metabólicas decorrentes da resistência à insulina, e têm sido propostas para o tratamento do DT2, dentre elas a prática regular de exercícios físicos, modificações nos hábitos alimentares e ainda a utilização de fitoquímicos, tais como os flavanóis do cacau (BISSON *et al.*, 2008; UMPIERRE *et al.*, 2013; MARTIN *et al.*, 2016). Embora possam promover benefícios à saúde, a combinação destas intervenções, tais como o exercício físico e a suplementação dos flavanóis do cacau, em condições de obesidade e resistência à insulina ainda precisam ser elucidados. Portanto, a compreensão dos mecanismos associados às alterações da resistência à insulina nos diferentes tecidos e a compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na melhora do metabolismo em decorrência das intervenções não medicamentosas tem sido considerada de grande relevância em estudos experimentais.

1.1. Exercício físico e resistência à insulina

Na tentativa de reverter e/ou minimizar as alterações metabólicas decorrentes do da resistência à insulina e do DM2, os exercícios físicos têm sido considerados como uma estratégia não farmacológica efetiva para o controle da doença (ALBRIGHT *et al.*, 2000; YATES *et al.*, 2007; UMPIERRE *et al.*, 2013). A prática regular de exercícios físicos, de

forma supervisionada e controlada, é recomendada pelo Ministério da Saúde do Brasil, não apenas para a prevenção da doença, mas para minimizar as alterações metabólicas decorrentes da resistência à insulina e contribuir para a redução do risco de desenvolvimento de diversas comorbidades (BRASIL, 2013).

Diversos estudos demonstraram que tanto os efeitos agudos quanto crônicos do exercício físico sobre o controle glicêmico têm implicações importantes para indivíduos diabéticos (LIMA *et al.*, 2009; YI *et al.*, 2013; ROHLING *et al.*, 2016). Neste sentido, os efeitos benéficos do exercício físico já foram bem descritos na literatura.

A realização do exercício aeróbio com intensidade moderada pode aumentar a captação e utilização de glicose em tecidos periféricos, minimizar o quadro hiperglicêmico e reduzir o percentual de hemoglobina glicada (HbA1), promover a diminuição de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo e aumentar as concentrações de enzimas antioxidantes (BAYNARD, *et al.*, 2005; YATES, *et al.*, 2007; UMPIERRE, *et al.*, 2013). Além disso, o exercício físico aeróbio pode aumentar a oxidação de ácidos graxos, aumentar o fluxo de sangue para músculos esqueléticos, ativar vias de sinalização celular (independentes da insulina) culminando na translocação de GLUT4 à membrana celular, melhorando assim a sensibilidade à insulina, (ALBRIGHT *et al.*, 2000; COLBERG *et al.*, 2010; MCGINLEY, *et al.*, 2015).

O aprimoramento dos mecanismos moleculares associados à sensibilidade à insulina em resposta ao exercício físico pode estar relacionado ao aumento da expressão e/ou à ativação de proteínas reguladoras do metabolismo de carboidratos, tais como, o aumento na expressão de GLUT4, fosfatidilinositol-3 kinase (PI3K) e Akt (ROCKL *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2010). Além disso, diversos estudos demonstraram que mesmo uma única sessão de exercício físico pode melhorar a sinalização da insulina em diversos tecidos, incluindo, o tecido hepático (HOENE *et al.*, 2009), músculo esquelético e hipotálamo (FLORES *et al.*, 2006; ROPELLE *et al.*, 2006; PAULI *et al.*, 2008).

Embora os benefícios do treinamento aeróbico estejam bem descritos na literatura, os seus efeitos associados a diferentes intervenções nutricionais, tais como, a suplementação de polifenóis em condições de obesidade e resistência à insulina ainda são desconhecidos. Portanto, a compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na resposta aguda e crônica do exercício físico e da suplementação de flavanóis do cacau em diferentes tecidos periféricos

poderá elucidar os efeitos de ambas as intervenções sobre as alterações metabólicas e inflamatórias encontradas em condições de obesidade e resistência à insulina.

1.2. Suplementação de flavanóis e resistência à insulina

Intervenções nutricionais também têm sido consideradas de grande relevância para o controle das alterações decorrentes da resistência à insulina. Dietas ricas em polifenóis, especificamente em flavanóis, um grupo de flavonoides encontrados em diversas bebidas, tais como, chá verde e vinho, em vegetais e principalmente no cacau (*Theobroma cacao*), são eficientes para a prevenção de comorbidades e melhora do déficit cognitivo associado ao diabetes (BISSON *et al.*, 2008; SPENCER, 2010; DESIDERI *et al.*, 2012; SOKOLOV *et al.*, 2013; RUIJTERS *et al.*, 2013; BRICKMAN *et al.*, 2014).

Os polifenóis, ou compostos fenólicos, são obtidos das plantas, produzidos por elas por meio do metabolismo secundário, que têm sido amplamente estudados devido aos efeitos benéficos que proporcionam à saúde (BRAVO, 1998; EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011; YAMASHITA *et al.*, 2012; FERNADEZ-MILLAN *et al.*, 2015). Divididos em duas classes: taninos (polifenóis poliméricos) e flavonoides, os polifenóis presentes no cacau incluem o flavanol, flavonol, antocianinas, flavonas e flavanonas. Entre eles, os flavanóis são o mais abundantes, sendo a (+)-catequina e (-)-epicatequina os principais monômeros bioativos presentes no cacau (EFRAIM; ALVES; JARDIM, 2011).

Diversos estudos demonstraram que a ingestão aguda de flavanóis, especificamente (-)-epicatequina, pode aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico (VLACHOPOULOS *et al.*, 2005), e o fluxo sanguíneo para tecidos periféricos (HOOPER *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2016), e melhorar a vasorreatividade e função endotelial (HERMANN *et al.*, 2006; HEISS *et al.*, 2007; WEST *et al.*, 2014). Além disso, a melhora da capacidade antioxidante (HUSSAIN *et al.*, 2016), incluindo, aumento das enzimas glutathione peroxidase e redutase (FERNADEZ-MILLAN *et al.*, 2015), a diminuição das concentrações de espécies reativas de oxigênio e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (COOPER *et al.*, 2008), a diminuição das concentrações de citocinas de ação pró-inflamatórias (SHAY *et al.*, 2015; SUEN *et al.*, 2016) e consequentemente a diminuição do risco de doenças cardiovasculares e resistência à insulina (CURTIS *et al.*, 2012; YAMASHITA *et al.*, 2012; HOOPER *et al.*, 2012), também têm sido considerados os principais benefícios do consumo crônico de flavanóis.

Baseando-se nos efeitos conhecidos dos flavanóis, estudos recentes têm investigado os efeitos da suplementação desses polifenóis sobre o desempenho físico de atletas (SOMERVILLE; BRINGANS; BRAAKHUIS, 2017). Embora haja evidências que mesmo de forma aguda a suplementação de flavanóis possa contribuir para a redução do estresse oxidativo induzido pelo exercício físico (DAVISON *et al.*, 2012), melhorar a função vascular (BERRY *et al.*, 2010) e o metabolismo de gorduras e carboidratos durante a realização do exercício físico (ALLGROVE *et al.*, 2011; STELLINGWERFF *et al.*, 2014), parece que sua suplementação não apresenta efeitos ergogênicos sobre o desempenho físico de atletas (DECROIX *et al.*, 2018).

Especificamente no DM2, os monômeros bioativos do cacau, tais como, (+)-catequinas e (-)-epicatequinas, podem agir diretamente em diferentes vias de sinalizações no fígado, pâncreas, tecidos adiposos e músculo esquelético, culminando na diminuição do estresse oxidativo e do perfil inflamatório, no aumento da capacidade antioxidante, na redução da apoptose celular e na melhora da sensibilidade à insulina (FRANCIS *et al.*, 2008; MACREADY *et al.*, 2009; WLLIANS; SPENCER, 2012; MARTIN *et al.*, 2016).

Entretanto, os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos observados com a suplementação de flavanóis não foram totalmente elucidados. Estudos realizados em ratos diabéticos demonstraram que a suplementação de flavanóis pode aumentar a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (BETTAIEB *et al.*, 2014), da proteína quinase B (AKT/PKB) (CORDERO-HERRERA *et al.*, 2015) e da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (SANCHEZ *et al.*, 2010) levando ao aumento da sensibilidade à insulina, da captação de glicose, resultando conseqüentemente na diminuição do índice de avaliação da homeostase (HOMA-IR). Além disso, a suplementação de flavanóis pode reduzir a fosforilação de SREBP1-c (CORDERO-HERRERA *et al.*, 2015), diminuir as concentrações das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α (BETTAIEB *et al.*, 2014), TBARS e reduzir a atividade de caspase 3 (FERNANDEZ *et al.*, 2015) levando à diminuição da lipogênese, inflamação, estresse oxidativo e apoptose celular, respectivamente.

Embora a suplementação com flavanóis em longo prazo possa ocasionar diversos benefícios relacionados à saúde, os seus efeitos metabólicos agudos e crônicos associados ao exercício físico foram poucos investigados. Além disso, os efeitos da suplementação aguda de flavanóis *per si* e/ou combinada com o exercício físico sobre o desempenho físico em diabéticos e/ou resistentes à insulina ainda precisam ser elucidados. Do mesmo modo, não há

relatos na literatura se o treinamento físico aeróbio associado à suplementação crônica de flavanóis pode reverter e/ou minimizar as alterações metabólicas e inflamatórias decorrentes da resistência à insulina.

2 OBJETIVO GERAL DA TESE

O objetivo geral da tese foi verificar os efeitos agudos e crônicos do exercício físico e da suplementação de flavanóis do cacau sobre o desempenho físico, o metabolismo e mediadores inflamatórios em ratos resistentes à insulina.

Para alcançar o objetivo proposto, o presente trabalho está estruturado em dois estudos (capítulos) os quais visam: i) verificar os efeitos agudos (estudo 1); e ii) crônicos (estudo 2) do exercício físico e da suplementação de flavanóis do cacau sobre o desempenho aeróbico, o metabolismo e sobre o perfil inflamatório em ratos Wistar resistentes à insulina.

Os estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFGM, protocolo nº. 110 / 2016; ANEXO A) e todos os procedimentos realizados obedeceram aos Princípios Éticos da Experimentação Animal (CEUA-UFGM) e as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), sendo o pesquisador responsável pela presente tese capacitado no uso e manejo de animais de laboratório (ANEXO B).

Os estudos realizados nesta tese foram financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPEMIG) por meio da contemplação do projeto ECODIA (Exercise, Cocoa, Cognition and Diabetes). O projeto ECODIA é um projeto desenvolvido na Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil) sob a orientação da Prof^a. Dr^a Danusa Dias Soares, na Université de Lille (Lille, França) sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Elsa Heyman e na Vrije Universiteit Brussel (Bruxelas, Bélgica) sob a orientação do Prof. Dr. Romain Meeusen o qual objetiva-se estudar os efeitos do exercício físico e da suplementação de flavanóis do cacau sobre os aspectos cognitivos e metabólicos associados ao Diabetes *Mellitus*.

3 ESTUDO 1: Efeitos agudos da suplementação dos flavanóis do cacau (*Theobroma cacao*) sobre as respostas metabólicas e inflamatórias decorrentes do exercício submáximo em ratos resistentes à insulina

RESUMO

Introdução: A resistência à insulina é caracterizada por um estado crônico de hiperglicemia e está associada à obesidade e inflamação de baixo grau. Agudamente, a suplementação dos flavanóis do cacau (CF) melhora a vasorreatividade, a função cognitiva e aumenta a atividade de enzimas antioxidantes. Entretanto, os mecanismos fisiológicos envolvidos na captação de glicose, no perfil inflamatório e seus efeitos associados ao exercício físico ainda são desconhecidos em populações acometidas com doenças metabólicas. **Objetivo:** Explorar os efeitos da suplementação aguda *per si* de CF e/ou combinada com o exercício físico sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos na captação de glicose e nos mediadores inflamatórios de ratos resistentes à insulina. **Métodos:** 64 ratos Wistar machos (250 ± 10 g) foram alocados aleatoriamente em dois grupos: controle (CON, n=32) e resistentes à insulina (IR, n= 32). A resistência à insulina associada à obesidade foi induzida por meio de uma dieta hiperlipídica associada à ingestão de bebida enriquecida com frutose durante 30 dias. Após este período, os ratos de cada grupo (CON e IR) foram suplementados por gavagem oral com solução de CF ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corporal) ou solução placebo (PLA) e permaneceram por 30 minutos em repouso ou foram submetidos à corrida em esteira com intensidade 60% $\text{VO}_{2\text{peak}}$ pelo mesmo período. Os ratos foram eutanasiados 30 minutos após a sessão experimental. As concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias no fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculo esquelético foram quantificadas por ELISA. A expressão gênica de TRB3 e CPT1 no fígado e músculo esquelético foram avaliadas por qPCR real-time e a fosforilação das proteínas Akt e AMPK por imunohistoquímica. **Resultados:** A suplementação aguda de CF *per si* atenuou a hiperglicemia após a realização do exercício aeróbico submáximo nos ratos IR ($p < 0,001$). No fígado, CF promoveu efeitos aditivos aos do exercício físico na fosforilação da proteína Akt, possivelmente contribuindo para o aumento da captação de glicose nos ratos IR. O exercício aeróbico submáximo e CF também aumentaram a fosforilação de AMPK no fígado ($p < 0,001$) e no músculo esquelético ($p < 0,001$), reduziram a expressão de TRB3 ($p < 0,01$), aumentaram a expressão de CPT1 ($p < 0,001$) e melhoraram o perfil inflamatório no fígado, pâncreas, tecido adiposo e no músculo esquelético. **Conclusão:** Agudamente, a suplementação de CF previamente à realização do exercício aeróbico submáximo promoveu a ativação de proteínas e genes envolvidos na captação e metabolismo da glicose e lipídios e melhorou os mediadores inflamatórios dos ratos com resistência à insulina.

Palavras-chaves: Diabetes do tipo 2, captação de glicose, citocinas, polifenóis, exercício físico.

INTRODUÇÃO

O diabetes do tipo 2 (DM2) é uma complexa doença resultante de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. O sedentarismo e o consumo de dietas hipercalóricas têm sido considerados os principais contribuintes para o aumento da incidência e desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina na população mundial (SKYLER *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2018). A resistência à insulina precede o diabetes do tipo 2 e está altamente associado à obesidade e inflamação de baixo grau (De FRONZO *et al.*, 2015). O aumento de citocinas inflamatórias, incluindo interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) promove, dentre outros, a inibição da via de sinalização da insulina contribuindo para o status hiperglicêmico no DM2 (CHENG *et al.*, 2015).

Recentemente, estudos demonstraram que a proteína *mammalian Tribbles homolog 3* (TRB3) promove disfunção no metabolismo de glicose e está altamente expressa em quadros de obesidade e resistência à insulina (NOURBAKHSI *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2019). A proteína TRB3 é capaz de se ligar diretamente à proteína Akt inibindo sua fosforilação e diminuindo a captação de glicose no fígado, músculo esquelético e no tecido adiposo (CHOI *et al.*, 2019). Especificamente no fígado, a inibição da proteína Akt promove o aumento da glicogenólise e da gliconeogênese favorecendo a liberação hepática da glicose e consequentemente o aumento da glicose sanguínea (MARINHO *et al.*, 2015). A glicogenólise e a gliconeogênese hepática são os principais determinantes da hiperglicemia de jejum no DM2. Cronicamente, o status hiperglicêmico promove o aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e endotelial, inflamação, além de complicações micro e macrovasculares (De FRONZO *et al.*, 2015). Portanto, estratégias capazes de atenuar as complicações metabólicas e inflamatórias associadas à resistência à insulina têm sido consideradas de grande relevância no cenário atual.

O exercício físico representa uma estratégia não farmacológica efetiva para o controle glicêmico no DM2 (YATES *et al.*, 2007; UMPIERRE *et al.*, 2013). O treinamento aeróbico realizado com intensidade moderada (55-65%VO_{2max}) pode promover diversos benefícios para indivíduos com resistência à insulina, incluindo, aumento da densidade mitocondrial e de enzimas antioxidantes, melhora da sensibilidade à insulina e da vasorreatividade periférica, além de reduzir a hemoglobina glicada e as citocinas inflamatórias (COLBERT *et al.*, 2016). Adicionalmente, de forma aguda o exercício aeróbico também é capaz de aumentar a captação

de glicose, reduzir a expressão de TRB3 no fígado e reduzir a produção hepática de glicose (LIMA *et al.*, 2009).

Intervenções nutricionais associadas ao exercício físico, também têm sido consideradas de grande relevância no controle da disfunção metabólica ocasionada pela resistência à insulina. Dietas ricas em polifenóis, especificamente em flavanóis, um grupo de flavonoides encontrados em diferentes bebidas, tais como, chá verde, vinho, vegetais e em grande quantidade no cacau, têm demonstrado diversos benefícios para a saúde (BRAVO, 1998; VINAYAGAM; XU, 2015).

Os monômeros bioativos do cacau (*Theobroma cacao*), incluindo (-)-epicatequina e (+)-catequina, apresentam propriedades antioxidantes (HUSSAIN *et al.*, 2016) e anti-inflamatórias (SHAY *et al.*, 2015). Além disso, os flavanóis do cacau podem melhorar a vasorreatividade, a função endotelial (LIN *et al.*, 2016; HERMANN *et al.*, 2006; WEST *et al.*, 2014) e conseqüentemente reduzir o risco de doenças cardiovasculares e de resistência à insulina (CURTIS *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2015; NING REN, *et al.*, 2019).

Assim, em função de suas ações fisiológicas, diversos estudos têm investigado os efeitos da suplementação dos flavanóis do cacau sobre o desempenho físico em atletas (SOMERVILLE *et al.*, 2017; DECROIX *et al.*, 2018). Contudo, apesar da aparente ausência de efeitos ergogênicos em atletas, evidências indicam que a suplementação aguda dos flavanóis do cacau pode reduzir o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, melhorar a função vascular e alterar o metabolismo de lipídios e carboidratos durante a realização do exercício físico (DECROIX *et al.*, 2018). Entretanto, os seus efeitos no desempenho físico em populações que apresentam alterações metabólicas, tais como as observadas na resistência à insulina, ainda não foram investigados.

Cronicamente a suplementação com flavanóis do cacau agem diferentes vias de sinalizações no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo melhorando o perfil inflamatório, a capacidade antioxidante, a sensibilidade à insulina e conseqüentemente o metabolismo de glicose (MARTIN *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2017; NING REN, *et al.*, 2019). Entretanto, os mecanismos envolvidos na captação de glicose mediados pela suplementação aguda de flavanóis do cacau não foram completamente elucidados em populações acometidas com doenças metabólicas. Apesar de já ser conhecido que, agudamente o exercício físico aeróbico aumenta a captação de glicose em indivíduos resistentes à insulina (ROHLING *et al.*, 2016; SYLOW *et al.*, 2017), não se sabe se a

suplementação de flavanóis do cacau previamente à esta sessão de exercício pode potencializar os efeitos do exercício sobre o metabolismo glicídico e sobre as respostas inflamatórias nestas populações. Portanto, objetivamos explorar os efeitos agudos da suplementação dos flavanóis do cacau *per si* sobre o metabolismo glicídico em ratos resistentes à insulina bem como estudar estes mesmos parâmetros e analisar também as respostas inflamatórias nesta população, em resposta a uma sessão aguda de exercício aeróbico submáximo sem e com a suplementação aguda prévia com flavanóis do cacau.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Cuidados Éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG, protocolo nº. 110 / 2016 – ANEXO A) e realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Sessenta e quatro ratos Wistar machos (230-250g) provenientes do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais foram utilizados neste experimento. Os ratos foram alocados em caixas coletivas (4 ratos por caixa) e mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício com temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo 14/10h (ciclo claro iniciando às 5 horas e ciclo escuro às 19 horas) durante todo o período experimental.

Delineamento experimental

A figura 1 apresenta o delineamento experimental. Os ratos foram aleatorizados em dois grupos: controle (CON, n = 32) e resistentes à insulina (IR, n = 32). Para a indução de resistência à insulina nos ratos, foram realizados dois estudos preliminares aos dois apresentados nesta tese para a padronização de um modelo adequado de resistência à insulina. Inicialmente, em função de dados da literatura (REED *et al.*, 2000; SKOVSO, 2014; GHORBANZADEH *et al.*, 2016) verificamos os efeitos de única dose (35 mg kg^{-1} de massa corporal) de estreptozotocina (STZ) após o consumo de dieta hiperlipídica (HFD) por 30 dias. Os resultados obtidos mostraram que a combinação desta dieta e STZ foram capazes de induzir o ganho de peso dos ratos, promover alterações no teste de tolerância à insulina e tolerância oral à glicose. Entretanto, os valores glicêmicos (acima de 300 mg dL^{-1}) em jejum e a perda significativa da massa corporal durante os trinta dias após a administração de STZ indicaram que para estudos com intervenções crônicas com este modelo, poderia haver a necessidade de insulino terapia e/ou a administração de fármacos hipoglicemiantes para aumentar a sobrevivência dos ratos (MELO *et al.*, APÊNDICE A). Neste sentido, realizamos um

segundo estudo preliminar, no qual verificamos que o consumo de HFD combinado com a ingestão de bebida rica em frutose (FRT) durante 30 dias promoveu intolerância à glicose, aumentou as citocinas inflamatórias e modulou os parâmetros histomorfométricos no fígado, pâncreas e tecido adiposo, demonstrando ser um modelo útil, efetivo e de curto prazo de indução de resistência à insulina, apropriado para estudos com intervenções longas em ratos Wistar (MELO *et al.*, APÊNDICE B).

Assim, a resistência à insulina associada à obesidade foi induzida por meio do consumo de uma dieta hiperlipídica (HFD com a seguinte composição dos macronutrientes em %kcal totais: 48,39% gorduras, 21,54% proteínas; 30,06% carboidratos; densidade calórica de 457,9 kcal·100g⁻¹) combinada com a ingestão de bebida rica em frutose (solução 30%; Synth[®]), oferecida *ad libitum* durante 30 dias. A intolerância à glicose foi confirmada por meio do teste de tolerância oral à glicose (OGTT). Os ratos com escore corporal regular e com tolerância normal à glicose (CON) receberam ração padrão para roedores (composição macronutrientes %kcal totais: 8,53% gordura, 38,47% proteína; 52,99% carboidratos; densidade calórica 263,94 kcal·100g⁻¹; Presence[®] - Brasil) pelo mesmo período de tempo (MELO *et al.*, dados em submissão; APÊNDICE C).

Após a indução da resistência à insulina, os ratos dos dois grupos (CON e IR) foram aleatorizados e divididos em dois subgrupos os quais foram suplementados com solução placebo (n=16) ou flavanóis do cacau (n=16). Uma hora após a suplementação, estes dois subgrupos foram divididos novamente em outros dois subgrupos (figura 5), sendo um mantido em repouso por 30 minutos e outro submetido à corrida em esteira à 60% do consumo pico de oxigênio (VO_{2peak}) pelo mesmo período de tempo.

Os quatro subgrupos (n=8/subgrupo) de ratos CON (PLA.SED; PLA.EXE; COCOA.SED; COCOA.EXE) e os quatro subgrupos (n=8/subgrupo) de ratos IR (PLA.SED; PLA.EXE; COCOA.SED; COCOA.EXE) foram eutanasiados por decapitação 30 minutos após o fim da sessão experimental. Amostras de sangue foram colhidas, processadas e estocadas em freezer -80°C para posterior análise de glicose e insulina. O fígado, pâncreas, músculo esquelético gastrocnêmio e tecido adiposo epididimal foram coletados, pesados e estocados em freezer -80°C ou fixados em paraformaldeído para posterior análises de citocinas inflamatórias e expressão gênica de TRB3 e CPT1 ou quantificação de pAKT e pAMPK, respectivamente.

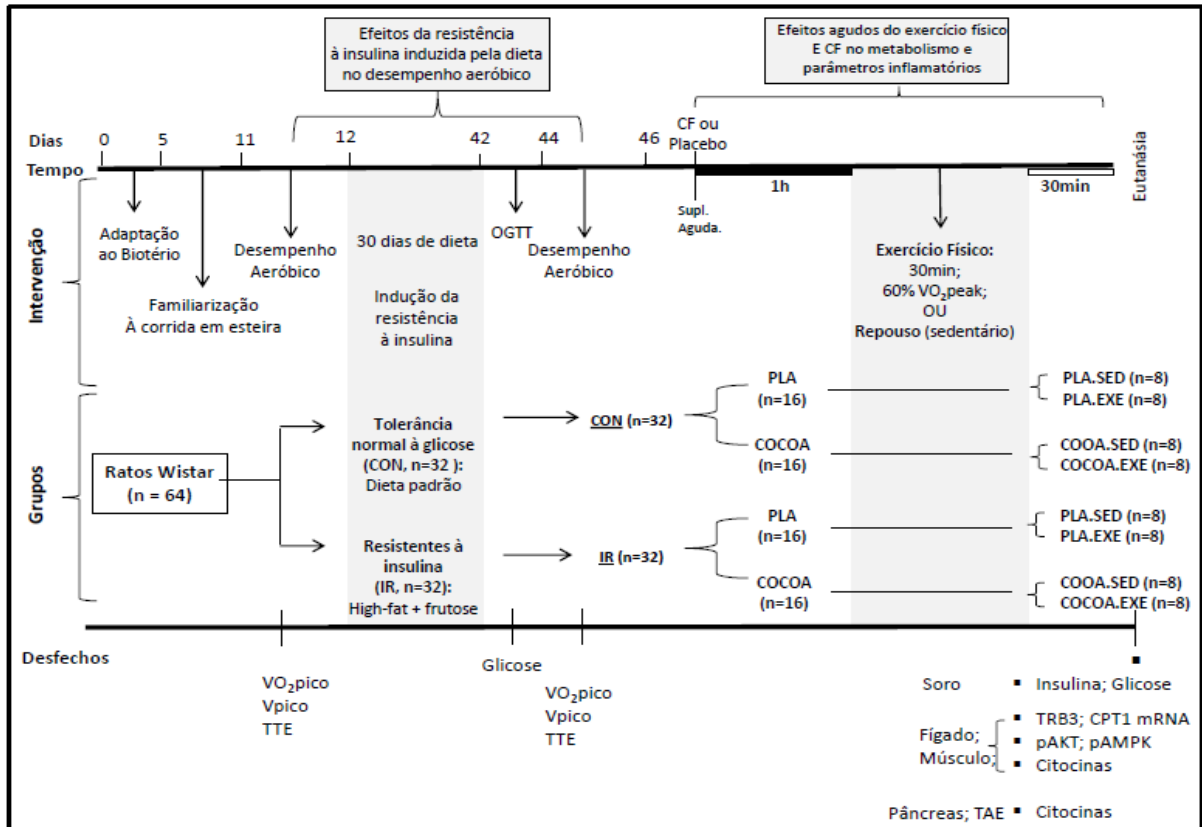


Figura 1. Delineamento experimental do estudo 1. OGTT: teste de tolerância oral à glicose; CON: ratos magros com tolerância normal à glicose; IR: Resistência à insulina; PLA: Placebo; SED: Sedentários (repouso); EXE: Exercício Físico; CF: Flavanóis do cacau; Suppl.: Suplementação; Vpico: Velocidade pico; TTE: Tempo Total de Exercício; TAE: Tecido adiposo epididimal.

Os efeitos da suplementação dos flavanóis do cacau sobre o desempenho físico foram investigados em um outro estudo realizado concomitante à esta tese na qual verificamos que a suplementação dos flavanóis do cacau prévia ao exercício físico não alterou o desempenho aeróbico dos ratos, entretanto, melhorou o metabolismo glicêmico durante a recuperação após o exercício físico em ratos resistentes à insulina (MELO *et al.*, dados em submissão, APÊNDICE D). Portanto, aqui exploramos os possíveis mecanismos fisiológicos envolvidos sobre os efeitos agudos da suplementação dos flavanóis do cacau e do exercício aeróbico submáximo sobre o metabolismo e mediadores inflamatórios.

Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT)

A intolerância à glicose foi confirmada pelo teste de tolerância oral à glicose (OGTT) após o jejum de 6 horas. Amostras de sangue foram obtidas através de lancetagem da extremidade distal da cauda nos momentos basal (0), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a gavagem oral de solução de glicose ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 40% solution, Synth[®]). As concentrações de glicose foram analisadas por meio de glicosímetro portátil (Accu-Check Performa[®], Roche Diagnostic, França).

Suplementação de flavanóis do cacau e solução placebo

A suplementação dos flavanóis do cacau foi realizada por meio do extrato em pó de cacau enriquecido com 30% de flavanóis (composição ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$): 1,39g (+)- catequinas; 6,10g (-)- epicatequinas, 0,89g cafeína; 5,01g teobromina, NATUREX[®] Powder, Avignon, França) dissolvido em água ($18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). A solução placebo (PLA) continham a mesma quantidade de cafeína e teobromina (composição ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$): 0,89g cafeína; 5,01g teobromina, SIGMA-ALDRICH[®], Missouri, EUA) que a solução com flavanóis de cacau (COCOA). As duas soluções (PLA e COCOA) foram administradas via gavagem oral uma hora previamente à realização do exercício aeróbico submáximo utilizando a mesma dose equivalente a $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corporal. A escolha do momento da suplementação (1 hora previamente ao exercício) se deve ao fato do pico de concentração no plasma de catequinas e epicatequinas em ratos Wistar. Em um estudo realizado em nosso laboratório, após a gavagem oral de solução com flavanóis do cacau (dose de $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corporal), identificamos que o pico de concentração de catequina e epicatequina no plasma dos ratos foi entre 60 e 75 minutos, respectivamente (TEIXEIRA *et al.*, APÊNDICE E).

Familiarização à corrida e teste incremental em esteira

Os ratos foram inicialmente familiarizados com corrida em esteira (Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain) por 10 minutos durante cinco dias consecutivos prévios à realização do primeiro teste incremental. A velocidade foi ajustada diariamente (10, 10, 11, 13 and $15 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$), com inclinação (5%) e estímulo elétrico de 0,2 mA mantidos durante toda a familiarização (adaptado de PRIMOLAS-GOMES, 2009).

O teste incremental de corrida na esteira para roedores iniciou com velocidade de $10 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ e consistiu de incrementos de $1 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ a cada três minutos. A fadiga foi determinada por meio da permanência dos ratos na grade de estímulo elétrico por 10 segundos ininterruptos. O consumo de oxigênio foi avaliado continuamente durante todo o teste incremental por meio de calorimetria indireta de fluxo aberto (Gas Analyzer Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain). O consumo de oxigênio pico ($\text{VO}_{2\text{peak}}$) foi considerado o maior valor obtido durante o protocolo incremental. O desempenho aeróbico foi avaliado pelo $\text{VO}_{2\text{peak}}$, tempo total de exercício (TTE) e pela velocidade pico (V_{peak}) obtidos durante o teste incremental. A V_{peak} foi considerada a maior velocidade registrada durante o teste incremental e ajustada pela equação $V_{\text{peak}} = v + (t/180)$, na qual v = velocidade completada no último estágio e t = tempo percorrido do estágio incompleto (KUIPERS *et al.*, 1985).

Ensaio de imun absorção enzimática (ELISA)

As concentrações de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 1 β (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram avaliadas no fígado, pâncreas, músculo gastrocnêmio e no tecido adiposo epididimal por meio de ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA; DuoSet kits DY506, DY522, DY501, and DY510, respectivamente). A concentração de insulina foi determinada por meio do kit EZRMI-13K (ELISA, EMD Millipore Corporation[®], MA, USA) e a glicose por meio do método colorimétrico (kit Gold Analisa[®], Belo Horizonte, Brasil). Todas as análises foram realizadas seguindo todas as recomendações do fabricante.

PCR quantitativo em tempo real para TRB3 e CPT-1 α

O RNA total foi isolado do fígado e do músculo gastrocnêmio utilizando 750 μ l de Trizol (Invitrogen; Life Technologies, Carlsbad, CA). O RNA foi ressuspense em 20 μ l de água DEPEC e tratadas com kit DNase (turbo-DNAFreeTM; Life Technologies) seguindo todas as recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi quantificada por espectrofotometria (Nanodrop, Wilmington). Um micrograma de RNA total foi reversamente transcrito com Superscript III RT (200 U/ μ l, SuperScript III Reverse Transcriptase; Life Technologies) usando *random primers* (100 ng/ μ l, Invitrogen; Life Technologies) a 25°C por 5 min, 50°C por 50 min e 70°C por 15 min (tabela 1). O RNA ribossômico 18S (50 nM of primers) foi utilizado como normalizador no presente estudo. A quantificação da expressão dos genes alvos foi realizada por meio do método comparativo do ciclo limiar (C_T). O valor de ΔC_T foi determinado por meio da subtração do C_T de cada amostra do normalizador (18S). A média do ΔC_T do grupo de ratos sedentários e suplementados com placebo (PLA-SED) foi subtraído de cada valor de ΔC_T , obtendo portanto o $\Delta\Delta C_T$. A expressão gênica relativa foi determinada por meio $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK *et al.*, 2001).

Tabela 1. Descrição dos primers utilizados no PCR quantitativo em tempo real

Gene	Referência	Sequência dos Primes (5' para 3')
Rattus TRB3	NM_144755	Forward: 5' TCGGTCGCTTTGTCTTCAGCAACT 3' Reverse: 5' ATCCAGTCACGCAGGCATCTT 3'
Rattus CPT-1 α	NM_031559	Forward: 5' TCCCAGGCAAAGAGACAGACTTGC 3' Reverse: 5' GCAGGCGCGAGCCCTCATAG 3'
Rattus 18S	AH001747	Forward: 5' CGGCTACCACATCCAAGGAA 3' Reverse: 5' GCTGGAATTACCGCGGCT 3'

TRB3: Mammalian homolog of Drosophila Tribbles 3; CPT1: Carnitine Palmitoyl-transferase 1.

Análises Imunohistoquímica

Amostras de fígado e músculo gastrocnêmio foram obtidas em diferentes áreas de seus parênquimas e fixadas em paraformaldeído. Após a fixação os fragmentos foram desidratados, clareados e embebidos em parafina. Secções de 5 µm foram montadas em lâminas e submetidas ao ensaio de imunoperoxidase utilizando os anticorpos primários de human/mouse/rat Phospho-Akt (S473) Pan Specific Antibody (pAKT; Catalog number AF887, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e pAMPK alpha (Phospho-Thr172) antibody (pAMPK; Biorbyt Ltd, Cambridge, UK). Para a exposição dos epítomos específicos, as secções foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 95°C por 30min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio (3%) em PBS. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado utilizando solução de albumina sérica bovina (BSA) a 2%. As secções foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:200) overnight a 4°C em câmara úmida. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido em um corte de cada lâmina avaliada. O anticorpo secundário biotilado (Daki EnVision™ + Dual Link System-HRP) foi utilizado por 60 min. 3'3 diaminobenzidina (DAB) foi o substrato utilizado para as reações colorimétricas e as secções do fígado e músculo esquelético foram contracorados com hematoxilina.

As células marcadas com pAKT e pAMPK no fígado e no músculo gastrocnêmio foram fotografadas por meio de uma câmera digital (UC-50) acoplada ao microscópio (BX-60 Olympus). A quantificação da fosforilação foi realizada por meio do software ImageJ (ABRAMOFF *et al.*, 2004) e Adobe Photoshop CC 2017 (8 ratos por grupo, 15 imagens por rato) e 1000 células foram contadas para a quantificação total de células fosforiladas.

Análise estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão, exceto quando descrito nas legendas das figuras. As concentrações da glicose capilar em resposta ao OGTT e os parâmetros do desempenho aeróbico (VO_{2peak} , TTE and V_{peak}) obtidos antes e após o período de indução da resistência à insulina foram comparadas entre os grupos (IR vs. CON) e ao longo do tempo por meio ANOVA two-way com medidas repetidas no tempo. A área sob a curva (AUC) da glicose em resposta ao OGTT foi comparada entre ambos os grupos pelo teste T de Tukey.

A comparação dos efeitos agudos do exercício submáximo e da suplementação dos flavanóis sobre o metabolismo e parâmetros inflamatórios foi realizada por meio ANOVA two-way dentro de cada grupo (CON e IR) considerando *suplementação* (PLA ou COCOA) e *atividade* (SED ou EXE). As concentrações de glicose antes e durante a recuperação após a realização do teste incremental de corrida foi comparada por meio de ANOVA three-way considerando *grupo* (CON ou IR), *suplementação* (PLA ou COCOA) e *tempo* com medidas repetidas na *suplementação* e *tempo*. A área sob a curva (AUC) da glicemia capilar antes e após o teste incremental foi comparada por meio da ANOVA two-way considerando *grupo* (CON ou IR) e *suplementação* (PLA ou COCOA) com medidas repetidas na *suplementação*. Para todas as ANOVA supracitadas, quando encontradas interações significativas, o teste post hoc de Tukey foi realizado para comparar as diferenças entre os pares.

Em adição as análises de ANOVA, comparamos também os ratos IR e CON sedentários e suplementados com placebo (PLA+SED) por meio do teste T de Tukey para explorar o impacto da resistência à insulina nas vias moleculares do metabolismo da glicose. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software SigmaPlot (versão 11.0, SYSTAT SOFTWARE, USA), adotando o nível de significância de $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Efeitos do consumo da dieta hiperlipídica (high-fat) e bebida rica em frutose sobre o metabolismo da glicose e desempenho físico

Após trinta dias de intervenção, os ratos alimentados com dieta high-fat e bebida rica em frutose (IR) apresentaram aumento significativo na massa corporal ($401,37 \pm 39,23$ g vs. $380,81 \pm 27,61$ g; $p = 0,041$) e intolerância à glicose em resposta ao OGTT (figura 2a-b) quando comparado aos ratos CON. Além disso, ambos os grupos reduziram o desempenho físico após o período de indução de resistência à insulina, incluindo VO_{2peak} , TTE e V_{peak} , sem diferenças intergrupos (IR vs. CON) (figura 2c-e).

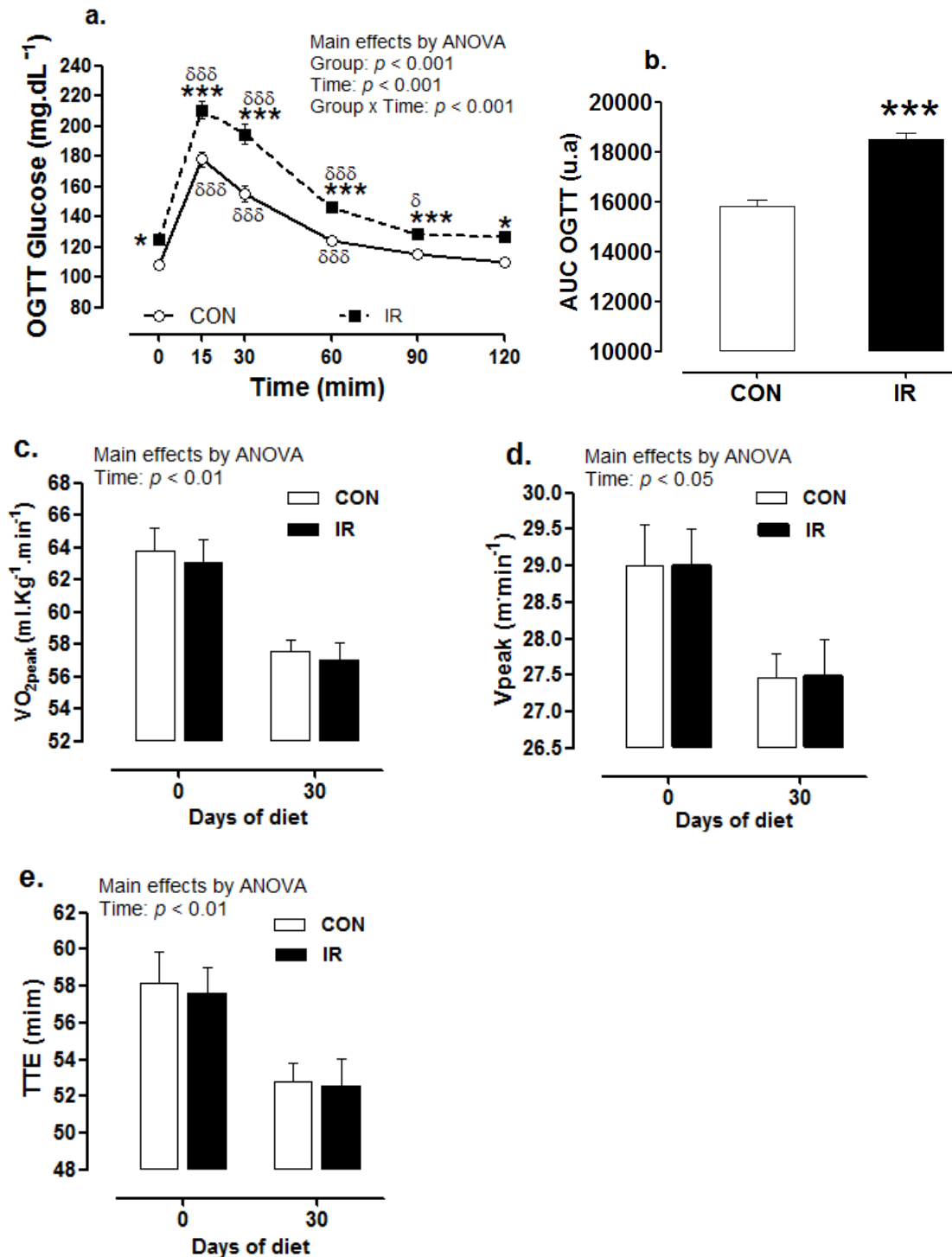


Figura 2. Teste de tolerância oral à glicose (a), área sob a curva do OGTT (b), consumo pico de oxigênio (c), velocidade pico (d) e tempo total de exercício (e) após 30 dias de consumo de ração padrão para roedores (CON) ou dieta hiperlipídica associada à ingestão de bebida rica em frutose (IR).

Dados expressos em média e erro padrão da média.

Figura 2b: teste-t de Tukey, *** $p < 0,001$ comparado com CON;

Figuras 2a,c,d,e: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos.

Análise post hoc para efeito de grupo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para ratos IR vs. CON;

Análise post hoc para efeito de tempo: δ $p < 0,05$; $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$, vs. baseline (0).

Velocidade média de corrida durante o exercício aeróbico submáximo e volume da solução de gavagem

O exercício aeróbico submáximo foi realizado durante 30 minutos a 60% $\text{VO}_{2\text{peak}}$ em esteira rolante, uma hora após a gavagem oral. A velocidade média de corrida equivalente à 60% $\text{VO}_{2\text{peak}}$ foi semelhante quando comparados os ratos IR e CON ($16,32 \pm 0,60$ vs. $15,94 \pm 0,40$ $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$; $F = 1.70$; $p = 0.202$, respectivamente) e também semelhante quando comparado os ratos suplementados com placebo e flavanóis do cacau ($16,77 \pm 0,70$ vs $15,72 \pm 0,38$ $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, $F = 0.04$; $p = 0.838$, respectivamente). O volume da solução administrada pela gavagem oral de solução placebo e flavanóis do cacau foi semelhante nos ratos CON ($F = 1.04$; $p = 0.316$; $F = 1.16$; $p = 0.290$) e nos ratos IR ($F = 0.09$; $p = 0.921$; $F = 0.04$; $p = 0.360$) independente da situação repouso (SED) ou exercício aeróbio (EXE), respectivamente.

Efeitos agudos da suplementação de flavanóis do cacau na concentração de glicose na recuperação ao teste incremental de corrida

O efeito agudo da suplementação dos flavanóis do cacau (CF) nas concentrações de glicose antes e após o exercício aeróbico submáximo em ratos controles e resistentes à insulina estão apresentados na figura 3. O aumento nas concentrações de glicose após a gavagem oral com solução placebo ou flavanóis do cacau foi observado nos ratos controles e resistentes à insulina independente da realização do exercício físico (Figura 3a,c; $F = 85.957$; $p < 0.001$). Nos ratos resistentes à insulina, a suplementação de flavanóis do cacau atenuou o aumento na concentração de glicose 60 minutos após a gavagem oral, possibilitando que os ratos suplementados com CF apresentassem menores valores glicêmicos prévio à realização do exercício físico quando comparados aos ratos suplementados com placebo (Figura 3c; $F = 3.827$; $p < 0.001$). Além disso, o quadro hiperglicêmico encontrado nos ratos resistentes à insulina após a realização do exercício aeróbico submáximo foi atenuado pela suplementação prévia de CF, demonstrando assim um efeito benéfico dos CF na melhoria do controle glicêmico durante a recuperação após o esforço (figura 3c,d; $F = 30.099$; $p < 0.001$).

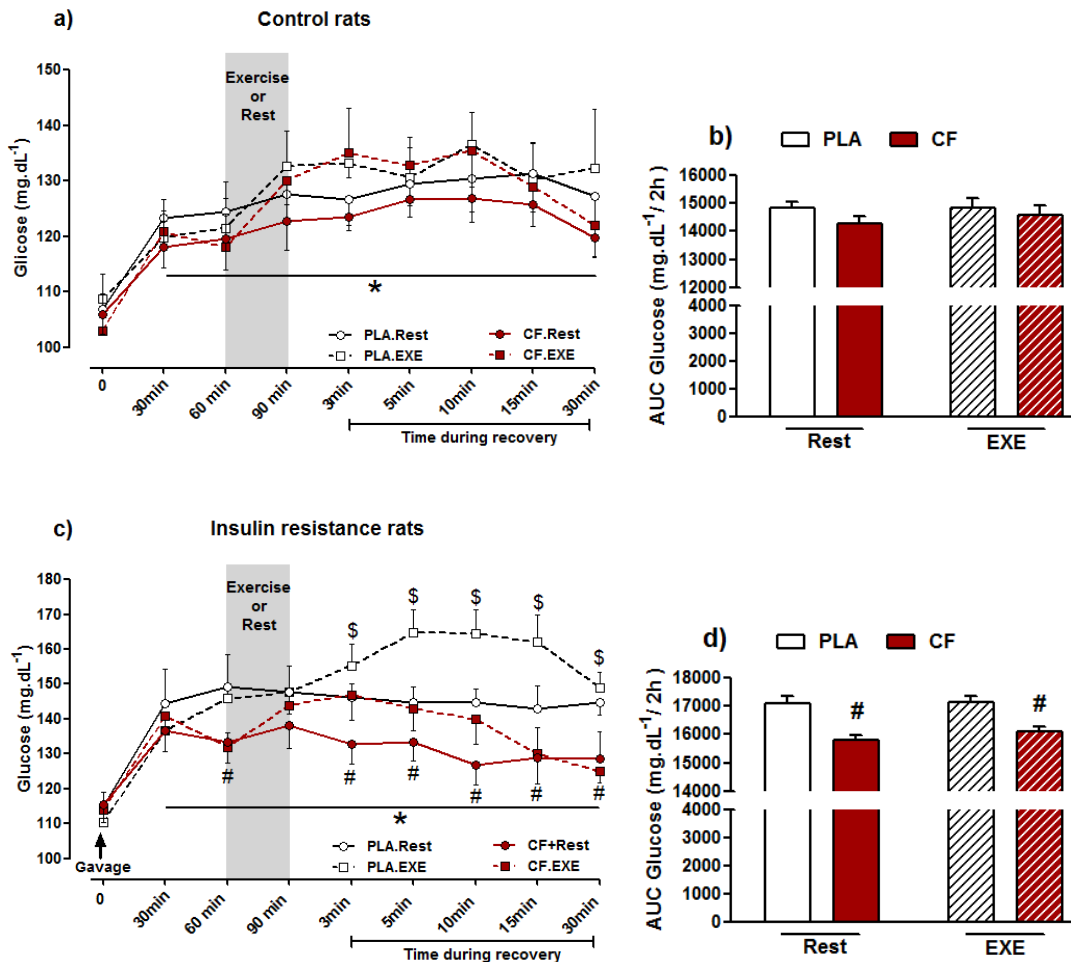


Figura 3. Efeitos agudos da suplementação dos flavanóis do cacau na concentração da glicose antes e após o exercício aeróbico submáximo.

Dados estão expressos em média e erro padrão da média.

Figuras 3a,d: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos;

Análise post hoc para efeito de atividade: \$ $p < 0,05$; para EXE vs. Rest;

Análise post hoc para efeito de tempo: * $p < 0,05$; vs. baseline (0);

Análise post hoc para efeito de suplementação: # $p < 0,05$; para PLA vs. COCOA.

Concentração de glicose e insulina

O exercício aeróbico submáximo realizado por 30 minutos a 60% VO_{2peak} reduziu a concentração de insulina nos ratos CON independente da suplementação dos flavanóis do cacau. Os ratos IR que permaneceram em repouso e suplementados com placebo apresentaram status de hiperglicemia e hiperinsulinemia quando comparado aos ratos CON na mesma condição, evidenciando o quadro de resistência à insulina. O exercício aeróbico submáximo e os flavanóis do cacau *per si* reduziram a concentração de insulina nos ratos IR, entretanto, sem efeitos aditivos quando combinados ambas intervenções. Além disso, o

exercício aeróbico submáximo reduziu a concentração de glicose nos ratos IR independente da suplementação dos flavanóis do cacau (figura 4).

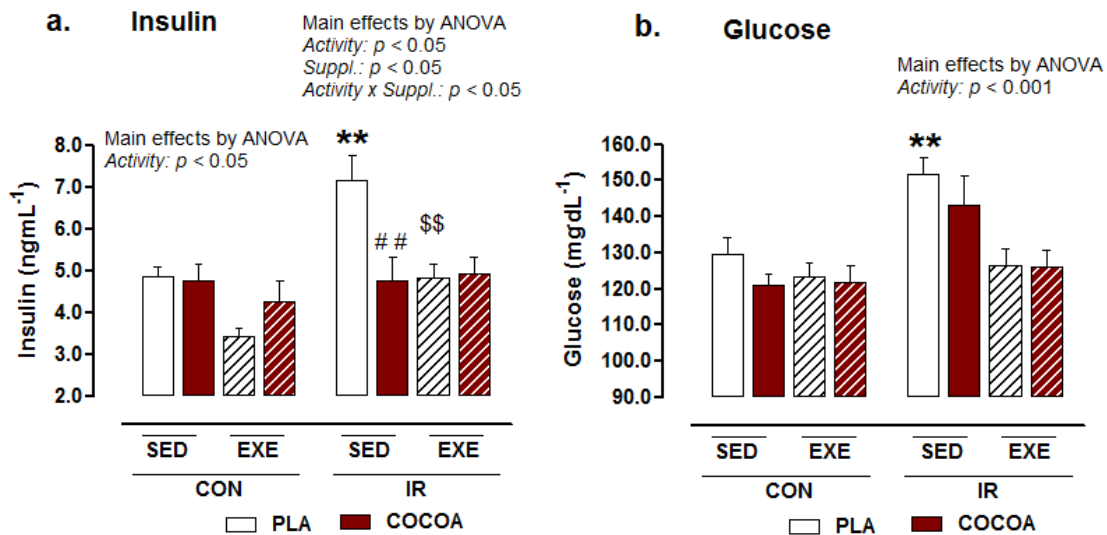


Figura 4. Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e dos flavanóis do cacau sobre a concentração de glicose e insulina em ratos CON e IR.

Dados estão expressos em média e erro padrão da média.

Figura 4a,b: Test-t de Tukey, ** $p < 0,01$ vs. ratos CON sedentários suplementados com placebo;

Figuras 4a,b: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos;

Análise post hoc para efeito de atividade: ; \$\$ $p < 0,01$; for EXE vs. SED;

Análise post hoc para efeito de suplementação: ## $p < 0,01$ for PLA vs. COCOA.

Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e dos flavanóis do cacau sobre parâmetros metabólicos e inflamatórios no fígado

Os ratos IR sedentários e suplementados com solução placebo apresentaram menor número de células marcadas com pAKT e pAMPK (figura 5c-d), menor expressão de CPT-1a (figura 5e), maior expressão de TRB3 (figura 5f) e maiores concentrações de IL-6 (figura 5g) e TNF- α (figura 5h) no fígado quando comparado aos ratos CON nas mesmas condições, caracterizando o perfil metabólico e inflamatório esperado no tecido hepático na resistência à insulina. A realização do exercício aeróbico submáximo e a administração de flavanóis do cacau resultaram, de maneira independente, no aumento da fosforilação de Akt e AMPK (figura 5c-d), da expressão de CPT-1a (figura 5e) bem como da concentração de IL-10 (figura 5j) e reduziram a expressão de TRB3 (figura 5f) e as concentrações de IL-6 (figura 5g) e

TNF- α (figura 5h) nos hepatócitos dos ratos IR. Entretanto, quando combinadas as intervenções, ou seja a realização do exercício após suplementação com os flavanóis do cacau, observou-se efeitos aditivos na fosforilação de Akt quando comparado à suplementação de flavanóis de cacau por si só (figura 5c). Nos ratos CON, houve efeito isolado da suplementação dos flavanóis do cacau, promovendo aumento na fosforilação de Akt e AMPK (pAKT e pAMPK, figura 5c-d), redução na expressão de TRB3 (figura 5e) e na concentração de TNF- α (figura 5h), independente da realização do exercício aeróbico submáximo.

Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e dos flavanóis do cacau sobre os parâmetros metabólicos e inflamatórios no músculo gastrocnêmio

Os ratos IR sedentários e suplementados com solução placebo apresentaram menor número de células marcadas com pAKT (figura 6c), maior expressão de TRB3 (figura 6f) e maiores concentrações de TNF- α (figura 6h) e IL-1 β (figura 6i) no músculo esquelético gastrocnêmio quando comparado aos ratos CON nas mesmas condições, evidenciando também o perfil metabólico e inflamatório esperado no tecido muscular esquelético em decorrência da resistência à insulina. O exercício aeróbico submáximo e a suplementação com flavanóis do cacau aumentaram a pAkt e pAMPK (figura 6c-d), reduziram a expressão de TRB3 (figura 6f) e a concentração de IL-1 β (figura 6i) no músculo gastrocnêmio dos ratos IR, entretanto, sem efeito aditivo quando combinadas as intervenções. Além disso, nos ratos IR, o exercício aeróbico submáximo também reduziu a concentração de TNF- α , independente da suplementação dos flavanóis do cacau. Nos ratos CON, o exercício e os flavanóis do cacau aumentaram a pAkt e pAMPK (figura 6c-d) no músculo gastrocnêmio. Por outro lado, o exercício aeróbico submáximo aumentou a concentração de IL-6 (figura 6g) nos dois grupos de animais (CON e IR) independentes da suplementação com os flavanóis do cacau.

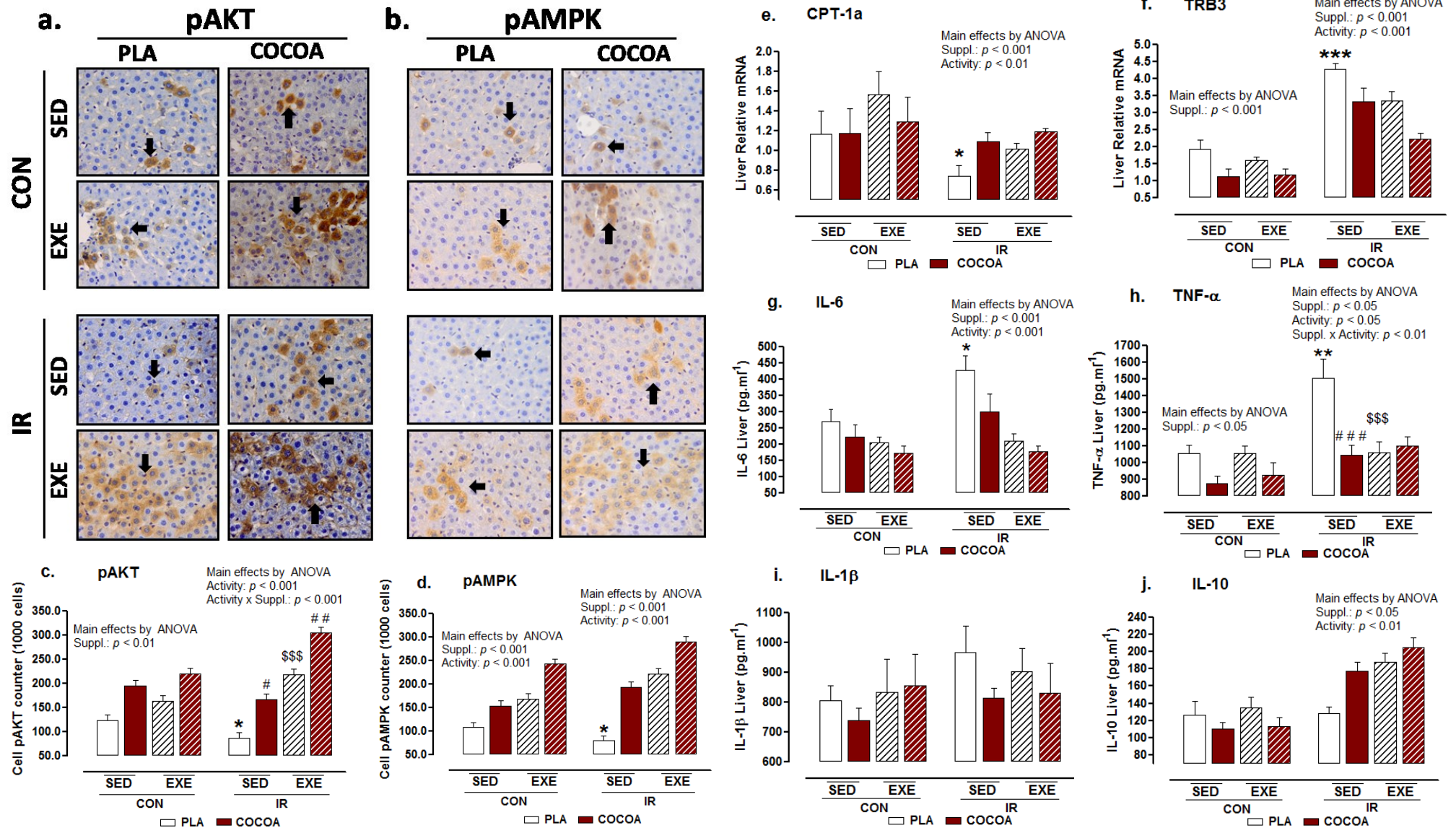


Figura 5. Efeitos agudos do exercício aeróbio submáximo e dos flavanóis do cacau na fosforilação de AKT e AMPK, na expressão gênica de TRB3 e CPT-1 α e nas citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no fígado de ratos CON e IR.

Dados estão expressos em média e erro padrão da média.

Figura 5c-h: Test-t de Tukey, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. ratos CON sedentários suplementados com placebo;

Figuras 5c-j: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos;

Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$\$ $p < 0,001$; para EXE vs. SED;

Análise post hoc para efeito de suplementação: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ para PLA vs. COCOA.

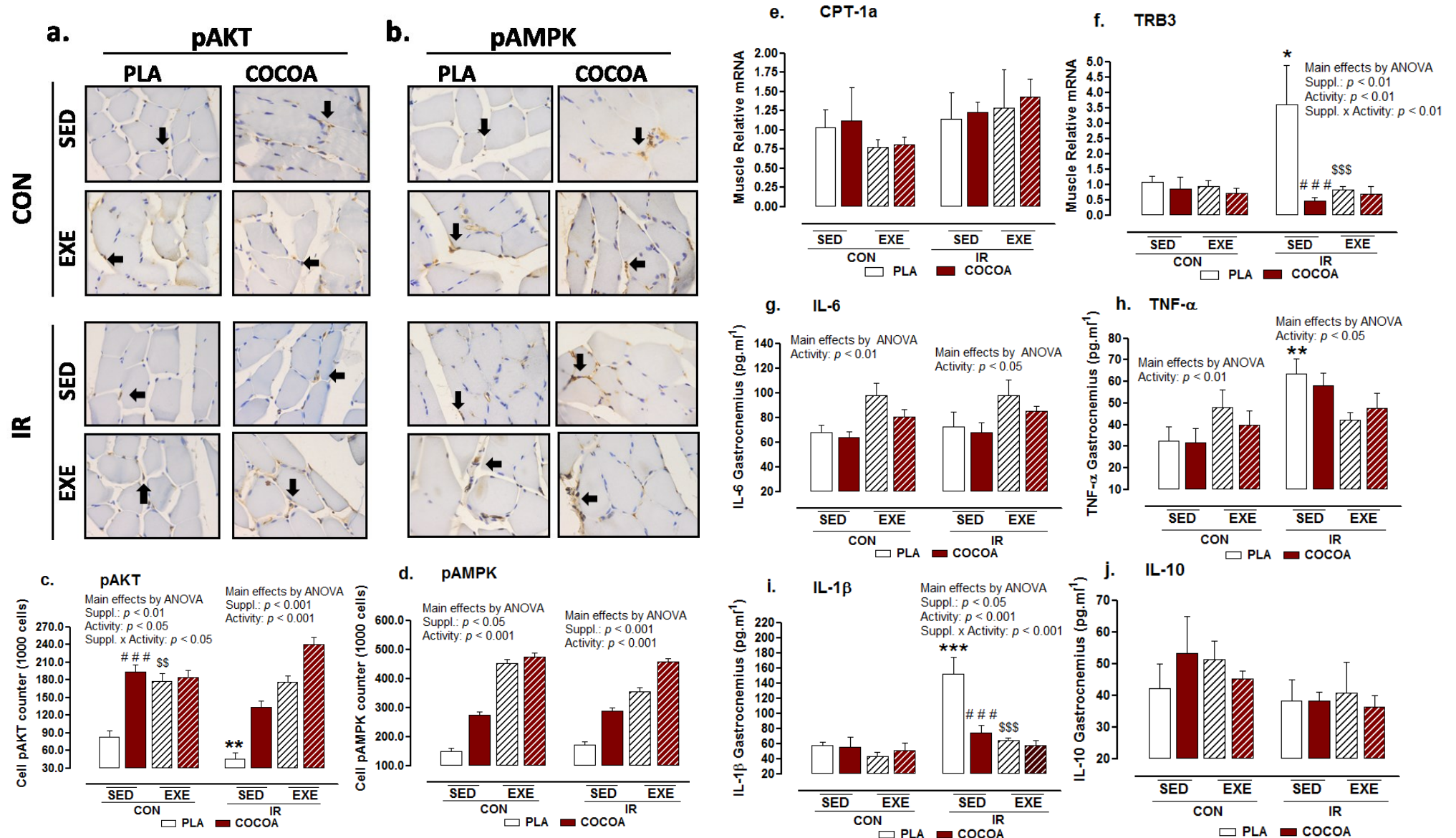


Figura 6. Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e dos flavanóis do cacau na fosforilação de Akt e AMPK, na expressão gênica de TRB3 e CPT-1 α e nas citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no músculo gastrocnêmio de ratos CON e IR..

Dados estão expressos em média e erro padrão da média;

Figura 6c,f,h,i: Teste-t, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. ratos CON sedentários suplementados com placebo;

Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$ $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.001$; para EXE vs. SED;

Análise post hoc para efeito de suplementação: #### $p < 0.001$ para PLA vs. COCOA.

Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e dos flavanóis do cacau sobre os parâmetros inflamatórios no pâncreas

Os ratos IR sedentários e suplementados com solução placebo apresentaram maior concentração de TNF- α (figura 7b) e menor de IL-10 (figura 7d) no pâncreas quando comparado aos ratos CON nas mesmas condições, indicando um perfil inflamatório coerente com a resistência à insulina. O exercício aeróbico submáximo reduziu a concentração de IL-6 (figura 7a) nos ratos IR independente dos flavanóis do cacau. A suplementação com flavanóis do cacau aumentou a concentração de IL-10 (figura 7d) nos ratos IR, entretanto, este efeito não ocorreu quando combinado ao exercício aeróbico. Além disso, a suplementação dos flavanóis do cacau também reduziu a concentração de IL-6 nos ratos CON (figura 7a), independente do exercício aeróbico submáximo.

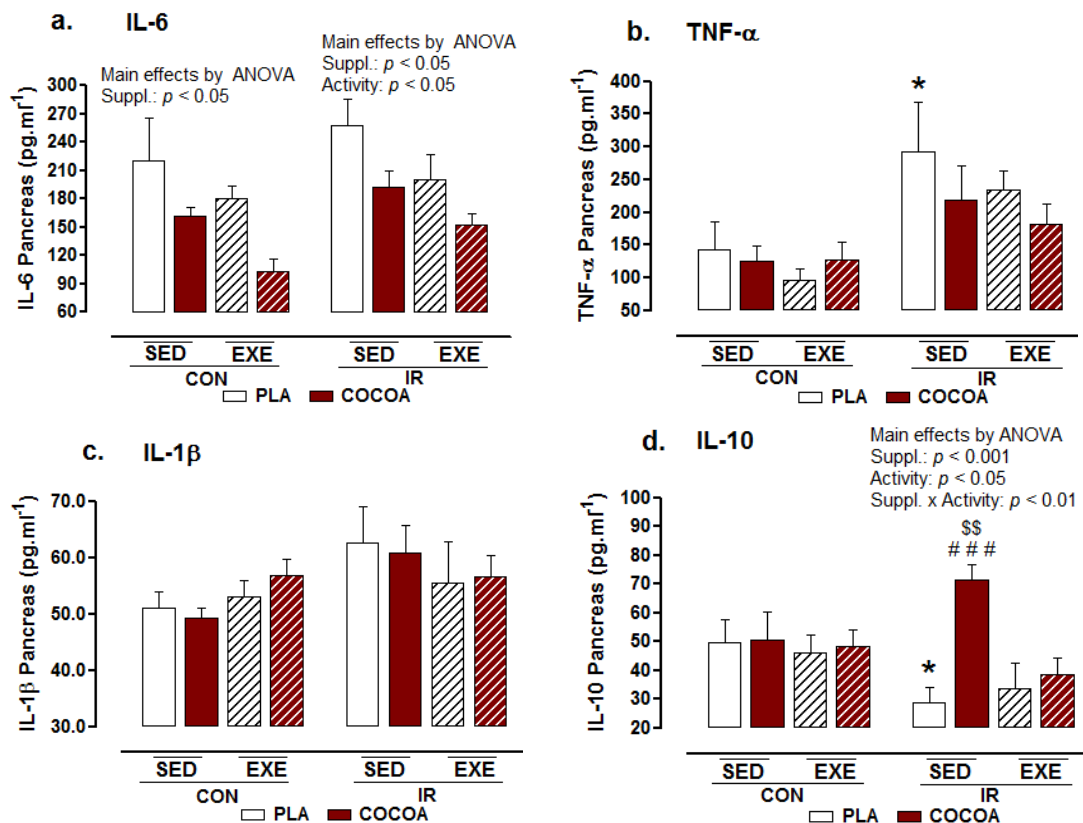


Figura 7. Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e da suplementação dos flavanóis do cacau sobre as concentrações de citocinas no pâncreas.

Dados estão expressos em média e erro padrão da média;

Figura 7b,d: Teste-t de Tukey, * $p < 0,05$ vs. CON sedentários suplementados com placebo;

Figuras 7a-d: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos;

Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$ $p < 0,01$ para EXE vs. SED

Análise post hoc para efeito de suplementação: ### $p < 0.001$ para PLA vs. COCOA.

Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e dos flavanóis do cacau sobre os parâmetros inflamatórios no tecido adiposo

Assim, como observado nos outros tecidos estudados, os ratos IR sedentários e suplementados com solução placebo apresentaram maiores concentrações de IL-6 (figura 8a) e TNF- α (figura 8b) além de menor concentração de IL-10 (figura 8d) no tecido adiposo epididimal quando comparado aos ratos CON nas mesmas condições, quadro característico da resistência à insulina. O exercício aeróbico submáximo e a suplementação dos flavanóis do cacau reduziram a concentração de TNF- α nos ratos IR (figura 8b), entretanto, sem efeitos aditivos quando combinadas as 2 intervenções. O exercício aeróbico também reduziu a concentração de IL-6 nos ratos IR (figura 8a), independente dos flavanóis do cacau. Nos ratos CON, a suplementação dos flavanóis do cacau aumentou a concentração de IL-10 (figura 8d) e diminuiu a concentração de TNF- α (figura 8b), independente do exercício aeróbico submáximo.

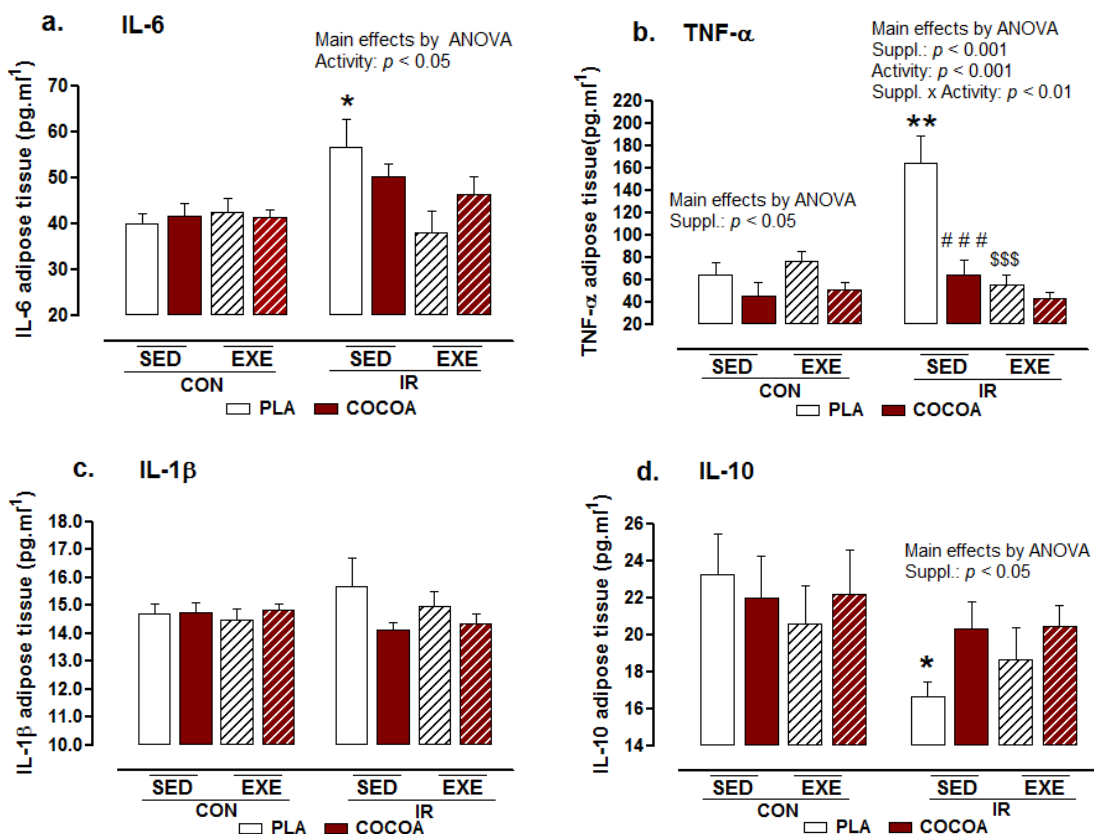


Figura 8. Efeitos agudos do exercício aeróbico submáximo e da suplementação dos flavanóis do cacau sobre as concentrações de citocinas no tecido adiposo.

Dados estão expressos em média e erro padrão da média.

Figura 8a,b,d: Teste-t-test de Tukey, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. ratos CON sedentários suplementados com placebo;

Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$\$ $p < 0.001$ para EXE vs. SED;

Análise post hoc para efeito de suplementação: #### $p < 0.001$ para PLA vs. COCOA.

DISCUSSÃO

A suplementação aguda de flavanóis do cacau prévio ao exercício aeróbico submáximo atenuou a hiperglicemia durante a recuperação após o esforço possivelmente por promover uma melhora nas vias de sinalização do metabolismo glicídico nos tecidos envolvidos na captação de glicose (principalmente músculo esquelético, fígado e tecido adiposo) em ratos resistentes à insulina. O exercício aeróbico submáximo e a suplementação dos flavanóis do cacau aumentaram a fosforilação de Akt e AMPK no fígado e no músculo esquelético e melhoraram o perfil inflamatório no pâncreas, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo nos ratos IR. Além disso, quando combinadas as duas intervenções, a suplementação dos flavanóis do cacau promoveu efeitos aditivos ao exercício aeróbico na fosforilação da Akt nos hepatócitos dos ratos IR.

O consumo da dieta hiperlipídica combinada à ingestão de bebida rica em frutose promoveu a intolerância à glicose 30 dias após o consumo da dieta. Nosso estudo prévio demonstrou que esta combinação da dieta hiperlipídica com a bebida rica em frutose, fornecida pelo mesmo período de tempo, promoveu alterações metabólicas e inflamatórias em diversos tecidos sendo considerado um modelo adequado para induzir resistência à insulina em ratos Wistar (MELO *et al.*, Apêndice II). Embora os parâmetros do desempenho aeróbico, incluindo, VO_{2peak} , V_{peak} e TTE tenham reduzido após o período da dieta, estas alterações foram similares às encontradas nos ratos alimentados com dieta padrão (CON), evidenciando aqui um efeito do tempo sobre os parâmetros do desempenho físico. Portanto, o consumo de hiperlipídica associada à ingestão de frutose por 30 dias, pode ser caracterizado como um modelo de resistência à insulina que não provoca diferenças no desempenho aeróbico quando comparados à ratos Wistar com escore corporal regular e apresentando tolerância normal à glicose.

Nossos resultados indicam que a suplementação aguda dos flavanóis do cacau atenuou a hiperglicemia dos ratos IR após o exercício aeróbico submáximo em esteira. Os mecanismos envolvidos no aumento da captação de glicose mediados pelos flavanóis do cacau podem estar associados ao aumento da vasodilatação periférica, mediada tanto pelo aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) quanto pela diminuição na produção das espécies reativas de oxigênio. Neste sentido, os flavanóis do cacau são capazes de inibir a enzima L-arginase, responsável pela inativação de NO e são também capazes de promover a ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), aumentando a conversão de L-arginina em L-

citrulina, elevando a disponibilidade de NO no endotélio vascular (HEISS *et al.*, 2006; FRAGA *et al.*, 2011). O óxido nítrico derivado do endotélio é um potente vasodilatador para os vasos periféricos favorecendo o suprimento de insulina aos diversos tecidos, contribuindo assim para a captação de glicose (KATZ *et al.*, 2011; STRAT *et al.*, 2016).

Embora diversos estudos tenham demonstrado que o consumo crônico de flavanóis do cacau pode ativar diferentes vias de sinalizações intracelulares no fígado, músculo esquelético, pâncreas e tecido adiposo melhorando a sensibilidade à insulina e consequentemente, a captação de glicose (MARTIN *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2017), os mecanismos fisiológicos envolvidos na captação de glicose mediados pela suplementação aguda dos flavanóis do cacau na resistência à insulina e no diabetes do tipo 2 ainda são pouco elucidados. Portanto, nós exploramos os possíveis mecanismos pelos quais o exercício aeróbico submáximo e a suplementação aguda de flavanóis do cacau podem melhorar a captação de glicose em diversos tecidos em ratos resistentes à insulina.

Em nosso estudo, o exercício aeróbico submáximo realizado à 60%VO_{2peak} por 30 minutos e a suplementação de flavanóis do cacau aumentaram a fosforilação de Akt e AMPK no fígado e no músculo esquelético, melhorando a captação de glicose em ratos IR, independente da ação da insulina. Além disso, no fígado, a suplementação dos flavanóis do cacau promoveu efeitos aditivos ao exercício aeróbico na fosforilação de Akt nos ratos IR.

A proteína Akt está envolvida em diversas vias de sinalização intracelular, incluindo, crescimento e síntese proteica, migração, proliferação e metabolismo da glicose (WHITEMAN *et al.*, 2002). No fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, a fosforilação da proteína Akt em substrato de tirosina promove a translocação de GLUT4 para a membrana celular aumentando a captação de glicose (WHITEMAN *et al.*, 2002; PETERSEN *et al.*, 2017).

Em cultura de células hepáticas (HepG2 cells) o tratamento por 24h com flavanóis do cacau aumentou a fosforilação do receptor de insulina e seu substrato 1/2 (IRS-1/2), aumentou a quantidade da enzima fosfatidilinositol 3 kinase (PI3K) e a fosforilação de Akt (CORDEIRO-HERREIRA *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem que os flavanóis do cacau podem ter uma ação direta nos hepatócitos. A fosforilação de Akt também promove a redução da glicogenólise e da gliconeogênese os quais poderiam explicar em parte a atenuação da elevação na concentração de glicose no período de recuperação, observada após o teste incremental de corrida nos ratos IR suplementados com flavanóis do cacau.

Especificamente no fígado, a fosforilação da proteína Akt promove a inibição da enzima glicogênio sintase kinase-3 (GSK3) uma enzima inibitória da enzima glicogênio sintase, promovendo conseqüentemente, a inibição da glicólise (BEUREL *et al.*, 2015). Além disso, a enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) também pode ser inibida pela fosforilação de Akt e AMPK, o que levaria à redução da gliconeogênese e conseqüentemente da produção hepática de glicose (CORDEIRO-HERRERA, *et al.*, 2013).

A proteína AMPK age como um sensor de energia intracelular e é ativada em resposta à uma variedade de estímulos estressores metabólicos que provocam aumento na razão AMP/ATP intracelular, decorrente do aumento da quebra de ATP e/ou redução da ressíntese de ATP, portanto, uma das principais proteínas envolvida no controle do metabolismo energético (FORETZ *et al.*, 2018). Devido ao fato da AMPK estar reduzida em vários tecidos em quadros de resistência à insulina e diabetes do tipo 2, diversos medicamentos que agem nas vias de sinalização desta molécula têm sido utilizados na clínica para o tratamento desta doença (ZHANG *et al.*, 2016). Durante o exercício físico, a ativação de APMK no músculo esquelético promove a translocação de GLUT4 para a membrana celular aumentando a captação de glicose independente da ação da insulina (ROHLING *et al.*, 2016; VIOLLET, 2017). Além disso, no fígado, a proteína AMPK é capaz de suprimir a gliconeogênese por meio da inibição da enzima PEPCK e aumentar assim a oxidação de ácidos graxos livres mediante a inibição da enzima acetil CoA carboxilase (ACC) e conseqüente diminuição da síntese de malonil-CoA, moléculas que agem inibindo a captação de ácido graxos para dentro da mitocôndria via ação da enzima CPT-1 (HARDIE, 2011; FORETZ *et al.*, 2018).

Outro resultado importante observado em nosso trabalho foi que o exercício aeróbico submáximo e a suplementação com flavanóis do cacau também aumentaram a expressão gênica da enzima CPT-1a no fígado dos ratos IR. A CPT-1a é uma importante proteína envolvida no metabolismo de lipídios promovendo a captação de ácidos graxos para dentro da mitocôndria, contribuindo assim para o processo de β -oxidação (QU *et al.*, 2016). Durante o exercício aeróbico com intensidade moderada (55-65% VO_{2max}), a ativação de AMPK, a inibição de ACC e malonil-CoA, reduzem a inibição de CPT-1 aumentando portanto, a captação de ácidos graxos e a oxidação de destes (LUNDSGAARD *et al.*, 2018).

O metabolismo de lipídios está comprometido em quadros de resistência à insulina, e a glicogenólise e a gliconeogênese hepática são considerados os principais mecanismos responsáveis pelo status hiperglicêmico em jejum na resistência à insulina e no diabetes do

tipo 2 (PETERSEN *et al.*, 2017). Assim, nossos resultados mostram que os aumentos na fosforilação de Akt e AMPK e na expressão gênica de CPT-1a mediados pelo exercício aeróbico submáximo e pela suplementação dos flavanóis do cacau podem contribuir efetivamente para a melhora das complicações metabólicas associadas à resistência à insulina, indicando, portanto, que as duas estratégias não farmacológicas pode promover a ativação de vias de sinalização no fígado e no músculo esquelético envolvidas diretamente no metabolismo de lipídios e da glicose.

Outra proteína envolvida no metabolismo é a TRB3. Demonstramos que além do exercício aeróbico submáximo, a suplementação dos flavanóis do cacau também reduziu a expressão gênica desta proteína (TRB3) no fígado e no músculo esquelético dos ratos IR.

A proteína TRB3 é capaz de se ligar diretamente na Akt inibindo a sua fosforilação em diversos tecidos, sendo superexpressa em quadros de obesidade e resistência à insulina (LIMA *et al.*, 2009). A inibição de Akt, mediada pela TRB3, promove o aumento na concentração da enzima PEPCCK mediada pela ativação da proteína Forkhead box class O protein (FOXO), favorecendo portanto, a glicogenólise e a gliconeogênese as quais contribuem para o status hiperglicêmico característico da resistência à insulina (MARINHO *et al.*, 2015). Além disso, a proteína TRB3 também é capaz de inibir a enzima AMPK e promover a ativação da enzima ACC, favorecendo o acúmulo de triglicerídeos (REN *et al.*, 2019). No músculo esquelético, a proteína TRB3 também pode promover a degradação de Akt por meio da estimulação do complexo ubiquitina-proteassoma (KWON *et al.*, 2018), além de induzir atrofia e redução da massa muscular em quadros de privação alimentar (CHOI *et al.*, 2019).

Embora os mecanismos fisiológicos envolvido na redução de TRB3 em decorrência do exercício físico e da suplementação de flavanóis do cacau ainda sejam desconhecidos, a proteína adaptadora endossomal (APPL1) parece participar dessa modulação. A APPL1 é aumentada pelo exercício aeróbico e compete diretamente com a TRB3 na ligação à proteína Akt, promovendo a sua fosforilação e contribuindo para a melhora do quadro de resistência à insulina (MARINHO *et al.*, 2015).

A inflamação de baixo grau presente na resistência à insulina também pode prejudicar a captação e o metabolismo de glicose em diversos tecidos. No presente estudo, nós demonstramos que os ratos IR apresentaram altas concentrações de citocinas inflamatórias em diversos tecidos, incluindo, IL-6 no fígado e no tecido adiposo, IL-1 β no músculo esquelético

e TNF- α no fígado, músculo esquelético, pâncreas e tecido adiposo quando comparado aos ratos CON. Entretanto, agudamente o exercício aeróbico submáximo e a suplementação dos flavanóis do cacau reduziram as concentrações destas citocinas nos ratos IR evidenciando uma melhora no perfil inflamatório destes animais.

Os flavanóis do cacau reduziram a concentração de IL-6 no fígado e no pâncreas, reduziram a concentração de TNF- α no fígado e no tecido adiposo, reduziram a concentração de IL-1 β no músculo esquelético e aumentaram a citocina anti-inflamatória (IL-10) no fígado, pâncreas e no tecido adiposo, independente do exercício aeróbico submáximo. Embora diversos mecanismos fisiológicos possam estar envolvidos nestas respostas, já foi mostrado que a ação anti-inflamatória mediada pelos flavanóis do cacau pode ser explicada pelo *downregulation* dos sinais sensíveis à redox, tais como, MAPK (ERK/JNK/p38), inibição da transcrição de genes envolvidos na síntese de citocinas inflamatórias, incluindo o fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) e complexo IKK (IKK1/IKK2/IK β), redução da atividade de enzimas chaves envolvidas na inflamação, tais como ciclooxigenase 2 (COX-2), diminuição da células de adesão vascular (VCAM) e das moléculas de adesão intracelular (ICAM) (ELLINGER *et al.*, 2016; GOYA *et al.*, 2016; MARTIN *et al.*, 2016). Portanto, em conjunto, a combinação da ação desses fatores, mediados pelos flavanóis do cacau, pode ter contribuído para a redução da síntese de citocinas inflamatórias observada nos diversos tecidos estudados.

O exercício aeróbico submáximo também reduziu a concentração de TNF- α no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, reduziu a concentração de IL-1 β no músculo esquelético e aumentou a concentração de IL-10 no fígado de ratos IR, independente dos flavanóis do cacau. Embora o exercício aeróbico tenha reduzido a concentração de IL-6 no fígado, promoveu o aumento desta citocina no músculo esquelético em ambos os grupos (CON e IR).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos no aumento de IL-6 no músculo esquelético após o exercício físico podem ser elucidados pelo aumento na concentração de Ca²⁺ citosólico mediado pela contração muscular, ativação do complexo calcineurin (CaN) e p38MAPK levando a ativação de fatores transcricionais envolvidos na síntese de citocinas inflamatórias (BENATTI *et al.*, 2015). A liberação de IL-6 pelo músculo esquelético durante o exercício físico contribui para adaptações e remodelamento da fibra muscular esquelética e está diretamente associada à intensidade e duração do exercício físico, além do conteúdo de glicogênio muscular e aptidão física dos indivíduos (OSTROWSKI *et al.*, 2000; PEDERSEN,

2017). Embora a IL-6 seja considerada uma citocina de ação pró-inflamatória, a ausência de aumento nas concentrações de TNF- α e IL-1 β após o exercício físico, mostram que a resposta inflamatória (observada pelo aumento da IL-6) é diferente entre a endotoxemia e a induzida pelo exercício (PEDERSEN, 2017). Além disso, a liberação de IL-6 pelo exercício agudo é um importante estímulo para aumentar a produção do receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) e IL-10 por meio das células mononucleares e consequentemente inibir a síntese e secreção de citocinas inflamatórias, tais como, IL-1 β e TNF- α (STEENSBERG *et al.*, 2003; BENATTI *et al.*, 2015).

Portanto, demonstramos os benefícios do exercício aeróbico submáximo e a suplementação aguda dos flavanóis do cacau sobre o metabolismo e parâmetros inflamatórios em diversos tecidos em ratos resistentes à insulina. Embora a resistência à insulina esteja associada à inflamação crônica de baixo grau, nossos resultados indicam que agudamente, o exercício aeróbico submáximo e os flavanóis do cacau promovem alterações nas concentrações de citocinas melhorando ao *milieu* inflamatório associado à resistência à insulina. Entretanto, nenhum efeito aditivo foi encontrado quando combinada ambas as intervenções.

CONCLUSÕES

Os flavanóis do cacau atenuaram a hiperglicemia induzida por um esforço físico de intensidade submáxima em ratos resistentes à insulina. A suplementação aguda destes polifenóis foi também capaz de promover alterações importantes nas vias de sinalização celular envolvidas na captação de glicose, levando, portanto, ao aumento da captação de glicose em tecidos como o músculo esquelético e fígado em ratos resistentes à insulina. Além disso, os flavanóis do cacau foram também capazes de promover, via alteração na fosforilação de proteínas chaves, a redução na produção hepática de glicose via glicogenólise e gliconeogênese nos ratos IR. Cabe salientar que no tecido hepático, os flavanóis do cacau trouxeram efeitos aditivos aos do exercício aeróbio na captação de glicose. Além disso, o exercício aeróbico submáximo e a suplementação dos flavanóis do cacau foram capazes de melhorar o metabolismo de glicose e oxidação de lipídios no fígado e no músculo esquelético de animais resistentes à insulina, bem como melhoraram o perfil inflamatório nestes e em outros tecidos destes animais.

Portanto, concluímos que a suplementação aguda de flavanóis do cacau associado ao exercício aeróbico submáximo é capaz de promover a ativação de vias de sinalização em

diversos tecidos, contribuindo para o aumento na captação e metabolismo da glicose e lipídios e a melhora do *milieu* inflamatório associados à resistência à insulina, melhorando de maneira geral a saúde desta população.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOFF, M.D.; MAGALHAES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.

ALI, F.; ISMAIL, A.; ESA, N.M.; PEI, C. Cocoa polyphenols treatment ameliorates visceral obesity by reduction lipogenesis and promoting fatty acid oxidation gene in obese rats through interfering with AMPK pathway. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 4, p. 564-575, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400581>.

BENATTI, F.B.; PEDERSEN, B.K. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases-myokine regulation. **Nature Review Rheumatology**, v. 11, n. 2, p. 86-97, 2015. DOI: [10.1038/nrrheum.2014.193](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.193).

BERHANE, F.; FITE, A.; DABOUL, N.; AL-JANABI, W.; MSALLATY, Z.; CARUSO, M.; LEWIS, M.K.; YI, Z.; DIAMOND, M.P.; ABOU-SAMRA, A.B; SEYOUM, B. Plasma lactate levels increase during hyperinsulinemic euglycemic clamp and oral glucose tolerance test. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, p. 1-7, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/102054>.

BEUREL, E.; GRIECO, S.F.; JOPE, R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions and diseases. **Pharmacology & Therapeutic**, v. 2014, n. 148, p. 114-131, 2015. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2014.11.016](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016).

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROOKS, G.A.; Importance of the “crossover” concept in exercise metabolism. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 1997, n. 24, p. 889-895, 1997.

CHENG, L.; CHENG, L.; WANG, H.; LIANG, F. Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 1-9, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/508409>.

CHOI, R.H.; McCONAHAY, A.; SILVESTRE, J.G.; MORISCOT, A.S.; CARSON, J.A.; KOH, H.J. TRB3 regulates skeletal muscle mass in food deprivation-induced atrophy. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 4, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1096/fj.201802145RR>.

COLBERG, S.R.; SIGAL, R.J.; YARDLEY, J.E.; RIDDEL, M.C.; DUNSTAN, D.W.; DEMPSEY, P.C.; HORTON, E.S.; CASTORINO, K.; TATE, D.F. Physical activity/exercise and diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 39, n. 11, p. 2065-2079, 2016. DOI: [10.2337/dc16-1728](https://doi.org/10.2337/dc16-1728).

CORDEIRO-HERREIRA, I.; MARTÍN, M.A.; BRAVO, L.; GOYA, L.; RAMOS, S. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via AKT and AMPK in HepG2 cells. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 2013, n. 57, p. 974-985, 2013. DOI 10.1002/mnfr.201200500.

CRAWFORD, S.O.; HOOGEVEEN, R.C.; BRANCATI, F.L.; ASTOR, B.C.; BALLANTYNE, C.M.; SCHIMIDT, M.I.; YOUNG, F.H. Association of blood lactate with type 2 diabetes: the Atherosclerosis risk communities carotid MRI study. **International Journal of Epidemiology**, v. 2010, n. 39, p. 1647-1655, 2010. DOI:10.1093/ije/dyq126.

CURTIS, P.J.; SAMPSON, M.; POTTER, J.; DHATARIYA, K.; KROON, P.A.; CASSIDY, A. Chronic ingestion of flavan3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes: a 1year, double-blind, randomized, controlled trial. **Diabetes Care**, v. 35, n. 7, p. 226–232, 2012. DOI: 10.2337/dc11-1443.

DAVISON, G.; CALLISTER, R.; WILLIAMSON, G.; COOPER, K.A.; GLEESON, M. The effect acute pre-exercise dark chocolate consumption on plasma antioxidant status, oxidative stress and immunoendocrine responses to prolonged exercise. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 69-79, 2012. DOI: 10.1007/s00394-011-0193-4.

De FRONZO, R. AL.; FERRANNINI, E.; GROOP, L.; HENRY, R. R.; HERMAN, W. H.; HOLST, J. J.; HU, F. B.; KAHN, C. R.; RAZ, I.; SHULMAN, G. I.; SIMONSON, D. C.; TESTA, M. A.; WEISS, R. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Prime**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2015. DOI: 10.1038/nrdp.2015.19.

DECROIX, L.; SOARES, D.D.; MEEUSEN, R.; HEYMAN, E.; TONOLI, C. Cocoa flavanols supplementation and exercise: A systematic review. **Sports Medicine**, n. 48, v. 4, p. 867-892, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0849-1>.

ELLINGER, S.; STEHLE, P. Impact of cocoa consumption on inflammation processes – A critical review of randomized controlled trials. **Nutrients**, v. 8, n. 321, p. 1-26, 2016. DOI: 10.3390/nu8060321.

FARAH, C.; MICHEL, L.Y.M.; BALLIGAND, J.L. Nitric oxide signaling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 1, p. 292-316, 2018. DOI: 10.138/nrcardio.2017.224.

FORETZ, M.; EVEN, P.C.; VIOLLET, B. AMPK activation reduces hepatic lipid content by increasing fat oxidation in vivo. **International Journal Molecular Science**, v. 2018, n. 19, p. 1-14, 2018. DOI:10.3390/ijms19092826.

FRAGA, C.G.; LITTERIO, M.C.; PRINCE, P.D.; CALABRÓ, V.; PIOTRKOWSKI, B.; GALLEANO, M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 63-67, 2011. DOI: 10.3164/jcbtn.11010FR.

GHORBANZADEH, V.; MOHAMMADI, M.; DARIUSHNEJAD, H.; CHODARI, L.; MOHADDES, G. Effects of crocin and voluntary exercise, alone or combined, on heart

VEGF-A and HOMA-IR of HFD/STZ induced type 2 diabetic rats. **Journal of Endocrinology Invest**, v. 1, n. 2, p. 1179-1186, 2016.

GOYA, L.; MARTIN, M.A.; SARRIÁ, B.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; BRAVO, L. Effects of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans. **Nutrients**, v. 8, n. 212, p. 1-22, 2016. DOI:10.3390/nu8040212.

HARDIE, D.G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. **Genes & Development**, v. 2011, n. 25, p. 1895–1908, 2011. DOI:10.1101/gad.17420111.

HEISS, C.; SCHROETER, H.; BALZER, J.; KLEINBONGARD, P.; MATERN, S.; SIES, H.; KELM, M. Endothelial function, nitric oxide and cocoa flavanols. **Journal of Cardiovascular and Pharmacology**, v. 47, n. 2, p. s128-s135, 2006.

HERMANN, F.; SPIEKER, L.; RUSCHITZKA, F.; SUDANO, I.; HERMANN, M.; BINGGELI, C.; LUSCHER, T. F.; RIENSEN, W.; NOLL, G.; CORTI, R. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. **Heart**, v. 92, n. 3, p. 119–120, 2006. DOI: 10.1136/hrt.2005.063362.

HESSELINK, M.C.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V.; SCHRAUWEN, P. Skeletal muscle mitochondria as target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, p. 633-645, 2016. DOI: 10.1038/nrendo.2016.104.

HU, C.; JIA, W. Diabetes in China: Epidemiology and genetic risk factors and their clinical utility in personalized medication. **Diabetes**, v. 67, n. 1, p. 3-11, 2018. DOI: 10.2337/dbi17-0013.

HUSSAIN, T.; TAN, B.; YIN, Y.; BLACHIER, F.; TOSSOU, M.C.; RAHU, N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 3, p. 1-9, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7432797>.

JANG, M.H.; KANG, N.H.; MUKHERJEE, S.; YUN, J.W. Theobromine, a methylxanthine in cocoa bean, stimulates thermogenesis by white fat browning and activating brown adipocytes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 6, p. 617-626, 2018. DOI 10.1007/s12257-018-0434-y.

KATZ, D.L.; DOUGHTY, K.; ALI, A. Cocoa and chocolate in human health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 10, p. 2779-2811, 2011. DOI: 10.1089/ars.2010.3697.

KELLEY, D.E.; HE, J.; MENSHIKOVA, E.V.; RITOV, V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2944–2950, 2002. DOI:10.2337/diabetes.51.10.2944.

KUIPERS, H.; VERSTAPPEN, F.T.; KEIZER, H.A.; GEURTEN, P.; VAN KRANENBURG, G. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. **International Journal of Sports Medicine**, v. 6, n. 4, p. 197-201, 1985. DOI: 10.1055/s-2008-1025839.

KWON, M.; EOM, J.; KIM, D.; KIM, J.; HEREDIA, J.; KANG, S.W.; SONG, Y. Skeletal muscle tissue TRIB3 links obesity with insulin resistance by autophagic degradation of Akt2. **Cell Physiology and Biochemistry**, v. 2018, n. 48, p. 1543-1555, 2018. DOI: 10.1159/000492264.

LIMA, A.F.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R.; CINTRA, D.E.; FREDERICO, M.J.; PINHO, R.A.; VELLOSO, L.A.; De SOUZA, C.T. Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. **Journal of Cellular Physiology**, v. 22, n. 1, p. 92-97, 2009. DOI: 10.1002/jcp.21833.

LIN, X.; ZHANG, I.; LIA, A.; MANSON, J. E.; SESSIO, H. D.; WANG, L.; LIU, S. Cocoa flavanol intake and biomarkers for cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 11, p. 2325-2333, 2016. DOI: 10.3945/jn.116.237644.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v. 25, n. 3, p. 402-408, 2001. DOI:10.1006/meth.2001.1262.

LOWELL, B.B.; SHULMAN, G.I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, v. 307, n. 21, p. 384-387, 2005. DOI: 10.1126/science.1104343.

LUNDSGAARD, A.M.; FRITZEN, A.M.; KIENS, B. Molecular regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle during aerobic exercise. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 18-30, 2018.

MARINHO, R.; MEKARY, R.A.; MUNOZ, V.R.; GOMES, J.R.; PAULI, J.R.; MOURA, L.P. Regulation of hepatic TRB3/Akt interaction induced by physical exercise and its effect on the hepatic glucose production in an insulin resistance state. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, n. 67, p. 1-7, 2015. DOI 10.1186/s13098-015-0064-x.

MARTIN, M.A.; GOYA, L.; RAMOS, S. Antidiabetic actions of cocoa flavanols. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 60, n. 8, p. 1756-1769, 2016. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500961>.

NING REN.; KIM, E.; LI, B.; PAN, H.; TONG, T.; YANG, C.S.; TU, Y. Flavonoids alleviating insulin resistance through inhibition of inflammatory signaling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 5361-5373, 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b05348.

NOURBAKHS, M.; SHARIFI, R.; GHORBANHOSSEMI, S.S.; JAVAD, A.; AHMADPOUR, F.; AZAR, M.R.; LARIJANI, B. Evaluation of plasma TRB3 and sestrin 2 levels in obese and normal-weight children. **Childhood Obesity**, v. 13, n. 5, p. 1-6, 2017. DOI: 10.1089/chi.2017.0082.

OSTROWSKI, K.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B.K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans – effects of intensity of exercise. **European Journal Applied Physiology**, v. 83, n. 6, p. 512-515, 2000. <https://doi.org/10.1007/s004210000312>.

PETERSEN, M.C.; VATNER, D.F.; SHULMAN, G.I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. **Nature Review Endocrinology**, v. 13, n. 10, p. 572-587, 2017. DOI:10.1038/nrendo.2017.80.

PRÍMOLA-GOMES, T. N.; CAMPOS, L. A.; LAUTON-SANTOS, S. BALTHAZAR, C. H.; GUATIMOSIM, S. CAPETTINI, L. S.; LEMOS, V. S.; COIMBRA, C. C.; SOARES, D. D.; CARNEIRO-JUNIOR, M. A.; QUINTAO-JUNIOR, J. F.; SOUZA, M. O.; CRUZ, J. S.; NATALI, A. J. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. **Journal Applied Physiology**, v. 107, n. 2, p. 593-598, 2009. DOI: 10.1152/jappphysiol.91218.2008.

QU, Q.; ZENG, F.; LIU, X.; WANG, Q.J.; DENG, F. Fatty acid oxidation and carnitina palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. **Cell and Disease**, v. 7, n. e2226, p. 1-9, 2016. DOI:10.1038/cddis.2016.132.

RAMOS, S.; MARTIN, M.A.; GOYA, L. Effects of cocoa antioxidants in type 2 diabetes mellitus. **Antioxidants**, v. 6, n. 84, p. 1-16, 2017. doi:10.3390/antiox6040084.

REED, M. J.; MESZAROS, K.; ENTES, L. J.; CLAYPOOL, M. D.; PINKET, J. G.; GADBOIS, T. M.; REAVEN, G. M. A new model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism**, v. 49, n. 11, p. 1390-1394, 2000.

REN, X.; CHEN, N.; CHEN, Y.; LIU, W.; HU, Y. TRB3 stimulates SIRT1 degradation and induces insulin resistance by lipotoxicity via COP1. **Experimental Cell Research**, v. 382, n. 1, 111428, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.009>.

ROHLING, M.; HERDER, C.; STEMPER, T.; MUSSING, K. Influence of acute and chronic exercise on glucose uptake. **Journal of Diabetes Research**, v.2016, n. 4, p. 1-34, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2868652>.

SHAY, J.; ELBAZ, H. A.; LEE, I.; ZIELSKE, S. P.; MALEK, M. H.; HUTTEMANN, M. Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes and neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, n. 7, p. 1-13, 2015. DOI: 10.1155/2015/181260.

SKOVSO, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 5, n. 1, p. 349-358, 2014. DOI: 10.1111/jdi.12235.

SKYLER, J.S.; BAKRIS, G.L.; BONIFACIO, E.; DARSOW, T.; ECKEL, R.H.; GROOP, L.; GROOP, P.H.; HANDELSMAN, Y.; INSEL, R.A.; MATHIEU, C.; McELVAINE, A.T.; PALMER, J.P.; PUGLIESE, A.; SCHATZ, D.A.; SONSENKO, J.M.; WILDING, J.P.H.; RATNER, R. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history and prognosis. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 241-255, 2017. DOI: 10.2337/db16-0806.

SOMERVILLE, V.; BRINGANS, C.; BRAAKHUIS, A. Polyphenols and performance: a systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 47, n. 8, p. 1589-1599, 2017. DOI: 10.1007/s40279-017-0675-5.

STEENSBERG, A.; FISCHER, C.P.; KELLER, C.; MOLLER, K.; PEDERSEN, B.K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American Journal of the**

Physiology, Endocrinology and Metabolism, v. 285, n. 2, p. 433-437, 2003. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00074.2003>.

STELLINGWERFF, T.; GODIN, J.P.; CHOU, C.J.; GRATHWOHL, D.; ROSS, A.B.; COOPER, K.A.; WILLIAMSON, G.; GORETTA, L.A. The effects of acute dark chocolate consumption on carbohydrate metabolism and performance during rest and exercise. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 39, n. 2, p. 173-182, 2014.

STRAT, K.M.; ROWLEY IV, T.J.; SMITHSON, A. T.; TESSEM, J.S.; HULVER, M.W.; LIU, D.; DAVY, K.P.; NEILSON, A.P. Mechanism by which cocoa flavanols improve metabolic syndrome and related disorders. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 35, n. 2016, p. 1-21, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.12.008>.

SYLOW, L.; KLEINERT, M.; RICHTER, E.A.; JENSEN, T.E. Exercise-stimulated glucose uptake-regulation and implications for glycaemic control. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 3, p. 133-148, 2017. DOI: 10.1038/nrendo.2016.162.

UMPIERRE, D.; RIBEIRO, P. A. B.; SCHAAN, B. D.; RIBEIRO, J. P. Volume of supervised exercise training impacts glycaemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with meta-regression analysis. **Diabetologia**, v. 6, n. 56, p. 242-251, 2013. DOI: 10.1007/s00125-012-2774-z.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition and Metabolism**, v. 12, n. 60, p. 1-20, 2015. DOI 10.1186/s12986-015-0057-7.

VIOLLET, B. The energy sensor AMPK: Adaptations to exercise, nutritional and hormonal signals. In.: Hormones, Metabolism and the benefits of exercise. **Research and Perspectives in Endocrine Interactions**, p. 13-24, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72790-5>.

WEST, S. G.; McINTYRE, M. D.; PIOTROWSKI, M. J.; POUPIN, N.; MILLER, D. L.; PRESTON, A. G.; WAGNER, P.; GROVES, L. F.; SKULAS-RAY, A. C. Effects of dark chocolate and cocoa consumption on endothelial function and arterial stiffness in overweight adults. **The British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 4, p. 653-661, 2014. DOI: 10.1017/S0007114513002912.

WHITEMAN, E.L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M.J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 10. 2002.

YARIBEYGI, H.; ATKIN, S.L.; SAHEBKAR, A. Mitochondrial dysfunction in diabetes and the regulatory roles of antidiabetic agents on the mitochondrial function. **Journal of Cellular Physiology**, v. 2019, n. 234, p. 8402-8410, 2019. DOI: 10.1002/jcp.27754.

YATES, T.; KHUNTI, K.; BULL, F.; GORELY, T.; DAVIES, M. J. The role of physical activity in management of impaired glucose tolerance: a systematic review. **Diabetologia**, v. 50, n. 6, p. 1116-1126, 2007. DOI: 10.1007/s00125-007-0638-8.

ZHANG, C.S.; LI, M.; MA, T.; ZONG, Y.; CUI, J.; FENG, J.W.; WU, Y.Q.; LIN, S.Y.; LIN, S.C. Metformin activates AMPK through the lysosomal pathway. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 11, p. 521-522, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.003>.

4 ESTUDO 2: Efeitos do treinamento físico aeróbico e da suplementação crônica de flavanóis do cacau (*Theobroma cacao*) sobre o desempenho físico, os parâmetros metabólicos e sobre os mediadores inflamatórios e lipídico em ratos resistentes à insulina

RESUMO

Introdução: O diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) é uma doença multifatorial caracterizada pelo estado hiperglicêmico crônico. Embora o consumo de flavanóis do cacau (CF) esteja associado à melhora da sensibilidade à insulina e a redução de processos inflamatórios associados ao DM2, os seus efeitos, quando suplementados cronicamente combinados ao treinamento aeróbico (EXE), sobre o desempenho aeróbico, metabolismo e perfil inflamatório em indivíduos e animais resistentes à insulina ainda são desconhecidos. **Objetivo:** Verificar os efeitos do EXE e da suplementação crônica de CF sobre o desempenho aeróbico, parâmetros metabólicos e perfis inflamatório e lipídico em ratos resistentes à insulina. **Métodos:** 32 ratos Wistar machos (230-250g) foram alimentados por meio de uma dieta hiperlipídica associada à ingestão de bebida rica em frutose durante 30 dias para a indução da resistência à insulina associada à obesidade. Após este período, os ratos foram balanceados e separados em quatro grupos os quais foram submetidos à gavagem oral de solução placebo ou suplementação de CF (45 mg·kg⁻¹ de massa corporal) e permaneceram sedentários ou realizaram corrida em esteira com intensidade de 60% da velocidade pico (Vpeak) durante 30 minutos. Este exercício na esteira e a gavagem foram realizadas uma vez ao dia, cinco dias por semana durante oito semanas. O desempenho físico foi avaliado pelo tempo total de exercício, velocidade pico e consumo máximo de oxigênio. Os ratos foram eutanasiados 48h após a última sessão de exercício sob jejum de 6 horas. Amostras de sangue foram colhidas e processadas para análise de glicose, insulina, perfil lipídico, leptina e adiponectina. As concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias foram quantificadas no fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculo esquelético por meio de ELISA. Análises morfométricas foram realizadas no pâncreas e tecido adiposo para a quantificação da área das ilhotas de Langerhans e dos adipócitos, respectivamente. GLUT4 foi quantificado no músculo esquelético por meio de imunohistoquímica. **Resultados:** A suplementação de CF e o EXE melhorou o desempenho físico, atenuou o ganho de massa corporal ($p = 0,034$ e $p = 0,049$), o índice de adiposidade ($p = 0,022$; $p = 0,034$) e a área dos adipócitos ($p = 0,001$ e $p < 0,001$). Quando analisados *per se*, tanto a suplementação de CF quanto o EXE melhoraram o quadro de intolerância à glicose e o perfil lipídico, reduziram as concentrações de leptina ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), glicose ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), insulina ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), o índice HOMA ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e melhoraram o *milieu* inflamatório nos tecidos estudados, entretanto, sem provocar efeitos aditivos quando combinadas as duas intervenções. Já no músculo esquelético, a suplementação de CF e o treinamento aeróbico *per se* aumentaram a expressão de GLUT4 ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), apresentando efeitos aditivos quando combinadas ambas as intervenções ($p < 0,001$ e $p < 0,001$). **Conclusão:** Em conjunto, nossos resultados demonstraram a eficácia dos flavanóis do cacau e do treinamento aeróbico em melhorar fatores-chaves no tratamento e prevenção da resistência à insulina, sugerindo que a combinação destas intervenções pode ser considerada uma estratégia de tratamento não farmacológico importante para o DM2.

Palavras-chaves: Diabetes do tipo 2, citocinas, GLUT4, chocolate, exercício físico.

INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) é uma doença multifatorial caracterizada pelo estado hiperglicêmico crônico ocasionado pela redução na captação de glicose em tecidos periféricos associado ao aumento da glicogenólise e gliconeogênese hepática decorrentes da resistência à ação da insulina (RODEN *et al.*, 2016; BRIL; CUSI, 2017). O DM2 representa aproximadamente 90-95% de todos os casos de diagnóstico de diabetes e a sua prevalência tem aumentado constantemente nas últimas décadas (WHO 2019). O consumo de dietas hipercalóricas associada ao sedentarismo são fatores marcantes para o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina na população mundial (CZECH, 2017). Neste sentido, intervenções nutricionais e a prática regular de exercícios físicos são importantes estratégias não medicamentosas para a prevenção e controle das alterações metabólicas ocasionadas pelo DM2 (RAVEENDRAN *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2019).

O exercício aeróbico é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e atenuar o estado hiperglicêmico do DM2 (KUMAR *et al.*, 2019). Além disso, o aumento da captação de glicose em tecidos periféricos independente da ação da insulina também tem sido associado aos efeitos benéficos do exercício aeróbico (EVANS *et al.*, 2019). Cronicamente, o exercício aeróbico é capaz de aumentar a quantidade de GLUT4 no músculo esquelético e tecido adiposo, reduzir o peso corporal, aumentar a capacidade antioxidante, melhorar o perfil inflamatório e lipídico contribuindo para a melhoria das complicações metabólicas decorrentes do DM2 (STANFORD *et al.*, 2014; YARIBEYGI *et al.*, 2019). Embora os benefícios do treinamento aeróbico estejam bem descritos na literatura, os seus efeitos associados às intervenções nutricionais, tais como, o consumo crônico de polifenóis em condições de obesidade e resistência à insulina ainda são muito pouco elucidados.

Os polifenóis são compostos orgânicos encontrados em diversas plantas. Divididos em classes, tais como, flavonoides, estilbeno, ácidos fenólicos e lignanas, o consumo crônico de polifenóis tem sido associado a diversos benefícios à saúde (CORY *et al.*, 2018; FRAGA *et al.*, 2019). Dietas ricas em flavanóis, um subgrupo de flavonoides encontrados no chá-verde, em alguns vegetais e em grande quantidade no cacau têm demonstrado ser uma estratégia importante para a redução do risco de desenvolvimento de obesidade (CORONADO-CÁCERES *et al.*, 2019), diabetes *mellitus* (RAMOS *et al.*, 2017; MASKARINEC *et al.*, 2018) e doenças cardiovasculares (LUDOVICI *et al.*, 2017).

Os compostos bioativos presentes no cacau (*Theobroma cacao*), tais como, a catequina e a epicatequina possuem diversas propriedades biológicas, incluindo ação anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (PRAKASH *et al.*, 2019). Além disso, a melhora da função endotelial (JIMÉNEZ *et al.*, 2012), o aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico e do fluxo sanguíneo cerebral, também tem sido associada ao consumo de dietas ricas em epicatequinas levando à melhora da função cardiovascular e funções cognitivas (HASKELL-RAMSAY *et al.*, 2018; DECROIX *et al.*, 2016; DECROIX *et al.*, 2019).

Embora os flavanóis derivados do cacau possam aumentar a secreção de insulina, melhorar a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos e prevenir danos oxidativos e inflamatórios associados ao DM2 (RAMOS *et al.*, 2017; FLORES, 2019), os seus efeitos associados ao treinamento aeróbico na resistência à insulina ou no DM2 ainda não foram investigados. Além disso, os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na possível melhora do desempenho aeróbico, metabolismo e mediadores inflamatórios decorrentes da combinação de ambas as intervenções ainda são desconhecidos. Portanto, no presente estudo objetivou-se verificar os efeitos do treinamento aeróbico e da suplementação crônica dos flavanóis do cacau sobre o desempenho aeróbico, metabolismo e mediadores inflamatórios e lipídicos em ratos resistentes à insulina (IR). Exploramos os mecanismos subjacentes às alterações no metabolismo e no perfil inflamatório em diversos tecidos periféricos, incluindo, fígado, pâncreas, músculo esquelético e tecido adiposo de ratos IR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Cuidados Éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG, protocolo n°. 110 / 2016 – ANEXO I) e realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Trinta e dois ratos Wistar machos (230-250g) provenientes do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais foram utilizados neste estudo. Os ratos foram alocados em caixas coletivas (4 ratos por caixa) e mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia do Exercício (Lafise-EEFFTO) com temperatura controlada ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo 14/10h (ciclo claro iniciando às 5 horas e ciclo escuro às 19 horas) durante todo o protocolo experimental.

Delineamento experimental

A figura 9 apresenta o delineamento experimental. A resistência à insulina associada à obesidade foi induzida por meio do consumo de dieta hiperlipídica (HFD, composição dos macronutrientes %kcal totais: 48,39% gorduras, 21,54% proteínas; 30,06% carboidratos; densidade calórica $457,9 \text{ kcal} \cdot 100\text{g}^{-1}$) combinada com a ingestão de bebida rica em frutose (solução 30%; Synth[®]), oferecida *ad libitum* durante 30 dias (MELO *et al.*, dados em submissão). A intolerância à glicose foi confirmada por meio do teste de tolerância oral à glicose (OGTT) realizado antes e após o período da dieta.

Após a indução e confirmação da intolerância à glicose, os ratos foram submetidos a um protocolo de intensidade incremental de corrida em esteira para avaliação do desempenho aeróbico. Em seguida, os ratos foram balanceados de acordo com a velocidade pico (V_{peak}) obtida no teste incremental e então separados em quatro grupos ($n = 8$ ratos/grupo), os quais foram submetidos à gavagem oral de solução placebo ou suplementação de flavanóis do cacau e permaneceram sedentários ou realizaram corrida em esteira com intensidade de $60\%V_{\text{peak}}$ durante 30 minutos. A intervenção foi realizada uma vez ao dia, cinco dias por semana durante oito semanas (semanas 5 a 12).

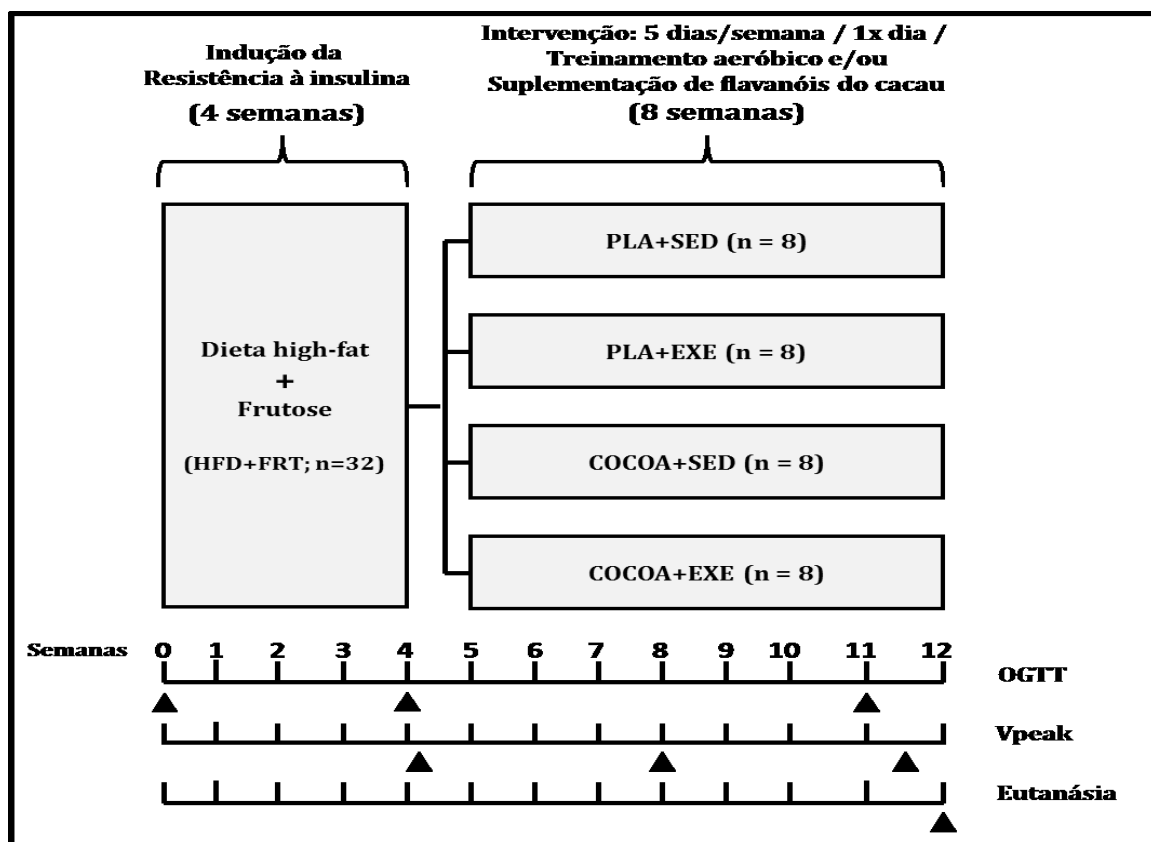


Figura 9. Delineamento experimental do estudo 2. OGTT: teste de tolerância oral à glicose; PLA: Placebo; SED: Sedentários; EXE: Exercício Físico; COCOA: Flavanóis do cacau; Suppl.; V_{peak} : Velocidade pico.

Após quatro semanas de intervenção com treinamento aeróbico os ratos foram submetidos novamente a um teste incremental de corrida em esteira para a avaliação do desempenho aeróbico e conseqüentemente para o ajuste, caso necessário, da velocidade correspondente à 60%V_{peak}. O teste de desempenho aeróbico e o OGTT foram realizados também ao final da última semana de intervenção para avaliar os possíveis efeitos da suplementação crônica dos flavanóis do cacau e/ou do treinamento aeróbico sobre estas variáveis. Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento aeróbico os ratos foram eutanasiados sob jejum de 6 horas por meio de decaptação em guilhotina sem sedação prévia. Amostras de sangue foram colhidas, processadas e estocadas em freezer -80°C para posterior análise de perfil lipídico, glicose, insulina, adiponectina e leptina. Fígado, pâncreas, músculo esquelético gastrocnêmio e tecido adiposo epididimal foram coletados, pesados e estocados em freezer -80°C ou fixados em paraformoldeído para posteriores análises de citocinas inflamatórias e quantificação de GLUT4 por meio de ELISA e imunohistoquímica, respectivamente.

Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT)

A intolerância à glicose foi confirmada pelo teste de tolerância oral à glicose (OGTT) após o jejum de 6 horas. Amostras de sangue foram obtidas através de lancetagem na extremidade distal da cauda nos momentos basal (0), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a gavagem oral de solução de glicose (1 g·kg⁻¹, 40% solution, Synth[®]). As concentrações de glicose foram analisadas por meio de glicosímetro portátil (Accu-Check Performa[®], Roche Diagnostic, França).

Suplementação de flavanóis do cacau e solução placebo

A suplementação dos flavanóis do cacau foi realizada por meio do extrato em pó de cacau enriquecido com flavanóis (composição (g·100g⁻¹): 1,39g (+)- catequinas; 6,10g (-)-epicatequinas, 0,89g cafeína; 5,01g teobromina, NATUREX[®] Powder, Avignon, França) dissolvido em água (18 mg·ml⁻¹). A solução placebo foi equilibrada com a suplementação dos flavanóis do cacau em cafeína e teobromina (composição (g·100g⁻¹): 0,89g cafeína; 5,01g teobromina, SIGMA-ALDRICH[®], Missouri, EUA). Ambas soluções (flavanóis do cacau e placebo) foram administradas via gavagem oral uma hora antes da realização do exercício aeróbico utilizando a dose equivalente à 45 mg·kg⁻¹ de massa corporal. A escolha do momento da gavagem (1 hora antes prévio ao exercício aeróbico) se deve ao fato do pico de

concentração de catequina e epicatequina no plasma de ratos ocorrer entre 60 e 75 minutos após a gavagem oral com solução de flavanóis do cacau (TEIXEIRA *et al.*, Apêndice IV).

Familiarização à corrida e teste incremental em esteira

Os ratos foram inicialmente familiarizados com corrida em esteira (Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain) por 10 minutos durante cinco dias consecutivos, previamente à realização do primeiro teste incremental. A velocidade foi ajustada diariamente (10, 10, 11, 13 and 15 m·min⁻¹), com inclinação (5%) e estímulo elétrico de 0,2 mA mantidos durante toda a etapa de familiarização (adaptado de PRIMOLAS-GOMES, 2009).

O teste incremental de corrida iniciou com velocidade de 10 m·min⁻¹ e consistiu de incrementos de 1 m·min⁻¹ a cada três minutos. A fadiga foi determinada por meio da permanência dos ratos na grade de estímulo elétrico por 10 segundos ininterruptos. O consumo de oxigênio foi avaliado continuamente durante todo o teste incremental por meio de calorimetria indireta de fluxo aberto (Gas Analyzer Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain). O consumo de oxigênio pico (VO_{2peak}) foi considerado o maior valor obtido durante o protocolo incremental. O desempenho aeróbico foi avaliado pelo VO_{2peak}, tempo total de exercício (TTE) e pela velocidade pico (V_{peak}) obtidos durante o teste incremental de corrida. A V_{pico} foi considerada a maior velocidade registrada durante o teste incremental e ajustada pela equação $V_{pico} = v + (t/180)$, na qual v = velocidade completada no último estágio e t = tempo percorrido do estágio incompleto (KUIPERS *et al.*, 1985).

Dosagens séricas

Após a coleta, o sangue foi centrifugado (1500 rpm x 20 minutos – Centrífuga SIGMA[®] 2K15). Alíquotas de soro foram separadas em tubos de plásticos de 2 mL (Eppendorfs[®]) e foram estocadas em freezer -80°C para as análises de glicose, insulina, leptina, adiponectina, colesterol total, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa (LDL) e alta densidade (HDL).

A glicose foi analisada por meio do método enzimático-colorimétrico (kit MS 80022230084 Glicose – PP, Gold Analisa[®], Belo Horizonte, Brasil); insulina (EMD Millipore Corporation[®] Kit – EZRMI-13K, MA, USA), leptina e adiponectina (Kit R&D systems) por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). A resistência à insulina foi avaliada por meio do modelo de avaliação da homeostase (*homeostasis model assessment* – HOMA2). O HOMA2-IR foi calculado por meio das concentrações plasmáticas de glicose e insulina em jejum

utilizando o *HOMA2 model calculator* (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator>) (LOZANO, *et al.*, 2016). As análises do perfil lipídico incluindo colesterol total, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa (LDL) e alta densidade (HDL) foram realizadas por meio do método enzimático-colorimétrico (kit LabTest[®] Diagnostica S.A. Lagoa Santa, Brasil).

Índice de adiposidade

Os tecidos adiposos retroperitoneal (TAR), mesentérico (TAM) e epididimal (TAE) foram pesados em balança (SHIMADZU[®] Modelo BL320H, precisão de 0,001g) para a determinação do índice de adiposidade (IA) por meio da seguinte equação: $IA = \left(\frac{TAR+TAM+TAE}{Massa\ corporal} \right) \times 100$ (LACERDA, *et al.*, 2015).

Citocinas pró e anti-inflamatórias: perfil inflamatório

As concentrações de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 1 β (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram avaliadas no fígado, pâncreas, músculo gastrocnêmio e no tecido adiposo epididimal por meio de ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA; DuoSet kits DY506, DY522, DY501, and DY510, respectivamente) seguindo todas as recomendações do fabricante.

Análises Imunohistoquímicas

Amostras do músculo gastrocnêmio foram obtidas em diferentes áreas de seus parênquimas e fixadas em paraformaldeído. Após a fixação os fragmentos foram desidratados, diafanizados e embebidos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em secções de 5 μ m, montados em lâminas histológicas (3 cortes/lâmina) e submetidas ao ensaio de imunoperoxidase utilizando o anticorpo primário de GLUT4 (NOVUS BIOLOGICALS, NBP1-49533, França). Para exposição dos epítomos específicos, as secções foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 95°C por 30 min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio (3%) em PBS. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado utilizando solução de albumina sérica bovina (BSA) à 2%. As secções foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:200) overnight a 4°C em uma câmara úmida. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido em um corte de cada lâmina analisada. O anticorpo secundário biotilado (Daki EnVisionTM + Dual Link System-HRP) foi utilizado por 30 min. O 3'3 diaminobenzidina (DAB) foi o

substrato utilizado para as reações e as secções do fígado e músculo esquelético foram contracordados com hematoxilina.

Para mensurar o efeito das intervenções sobre o padrão de distribuição de GLUT4 no músculo gastrocnêmio foram fotografados 15 campos por animal ($n = 8$) utilizando microscópio óptico (BX-60 Olympus) com câmera digital (UC-50) acoplada. As imagens foram avaliadas por meio do programa ImageJ (ABRAMOFF *et al.*, 2004) e o número de células marcadas foi obtido a partir do total de 1000 células contadas. GLUT4 também foi analisado no fígado (APENDICE F).

Análises morfométricas

O pâncreas e tecido adiposo foram seccionados em regiões variadas de seu parênquima e os fragmentos obtidos foram fixados por imersão em solução de Glutaraldeído 4% em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,3 por um período de 24 horas. Na sequência do processo, eles foram desidratados e incluídos em resina plástica histológica (LEICA® - HistoResin). Secções de 4 μ m foram inseridas em lâminas histológicas, coradas com azul de toluidina-borato de sódio e fotografadas (Câmera UC-50) em microscópio de luz (BX-60 Olympus) em aumento de 40X, as quais foram utilizadas para as análises morfométricas. A quantificação da área correspondente às ilhotas de Langerhans e dos adipócitos foram realizadas por meio do software ImageJ, utilizando 8 ratos por grupo e 15 fotos por animal experimental.

Análises estatísticas

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão, exceto quando descrito nas legendas das figuras. As concentrações da glicose capilar em resposta ao OGTT obtidos antes e após o período de indução da resistência à insulina (30 dias) foram comparadas entre os *momentos* (antes *vs.* após) e ao longo do *tempo* por meio da *ANOVA two-way* com medidas repetidas no *tempo*. A área sob a curva (AUC) da glicose em resposta ao OGTT foi comparada entre os momentos pelo teste T de Tukey.

A comparação dos efeitos do treinamento aeróbico e da suplementação crônica dos flavanóis do cacau sobre os parâmetros do desempenho aeróbico ($VO_{2\text{pico}}$, TTE e V_{peak}), sobre o metabolismo, parâmetros inflamatórios e perfil lipídico foi realizada por meio da *ANOVA two-way* considerando *suplementação* (PLA ou COCOA) e *atividade* (SED ou EXE). As concentrações de glicose em resposta ao OGTT obtidas antes e após o período de

intervenção com suplementação dos flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico foram comparadas por meio da *ANOVA three-way* considerando *suplementação* (PLA ou COCOA), *atividade* (SED ou EXE) e *tempo* com medidas repetidas na *suplementação* e *tempo*. A área sob a curva (AUC) da glicemia capilar foi comparada por meio da *ANOVA two-way* considerando *suplementação* (PLA ou COCOA) e *atividade* (SED ou EXE) com medidas repetidas na *suplementação*.

Para todas as *ANOVAs* supracitadas, quando encontradas interações significativas, o teste post hoc de Tukey foi realizado para comparar as diferenças entre os pares. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software SigmaPlot (versão 11.0, SYSTAT SOFTWARE, USA), adotando o nível de significância de $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Após trinta dias de consumo de dieta hiperlipídica associada à ingestão de bebida rica em frutose os ratos apresentaram aumento significativo na massa corporal ($375,57 \pm 10,24$ g vs. $256,42 \pm 6,36$ g; $p < 0,001$; $t = -119,50$) e intolerância à glicose (figura 10a-b) quando comparado ao momento pré dieta, respectivamente.

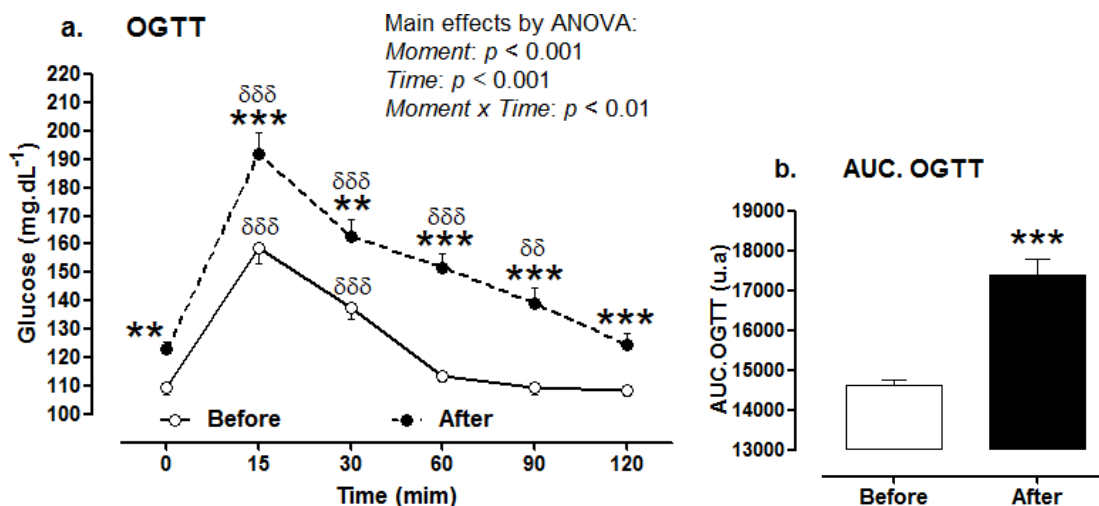


Figura 10. Teste de Tolerância Oral à Glicose (OGTT) realizado antes e após o consumo de dieta high-fat e bebida rica em frutose.

Dados estão expressos em média e erro padrão da média.

Figura 10b: Test-t de Tukey, *** $p < 0,001$ vs. Before;

Figura 10a: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos.

Análise post hoc para efeito de momento: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ para Before vs. After

Análise post hoc para efeito de tempo: $\delta\delta$ $p < 0.01$; $\delta\delta\delta$ $p < 0.001$, vs. baseline (0).

A suplementação crônica dos flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico atenuaram o ganho de massa corporal, reduziram o índice de adiposidade (figura 11a-b), promoveram

aumento nas concentrações de adiponectina (figura 11c) e na razão adiponectina / leptina (figura 11e) favorecendo, portanto, a melhora do controle neuroendócrino da homeostase energética e da disfunção do tecido adiposo, respectivamente. Os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico *per se* reduziram as concentrações de leptina ($p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente), entretanto, sem apresentar efeitos aditivos quando combinadas as duas intervenções (figura 11d).

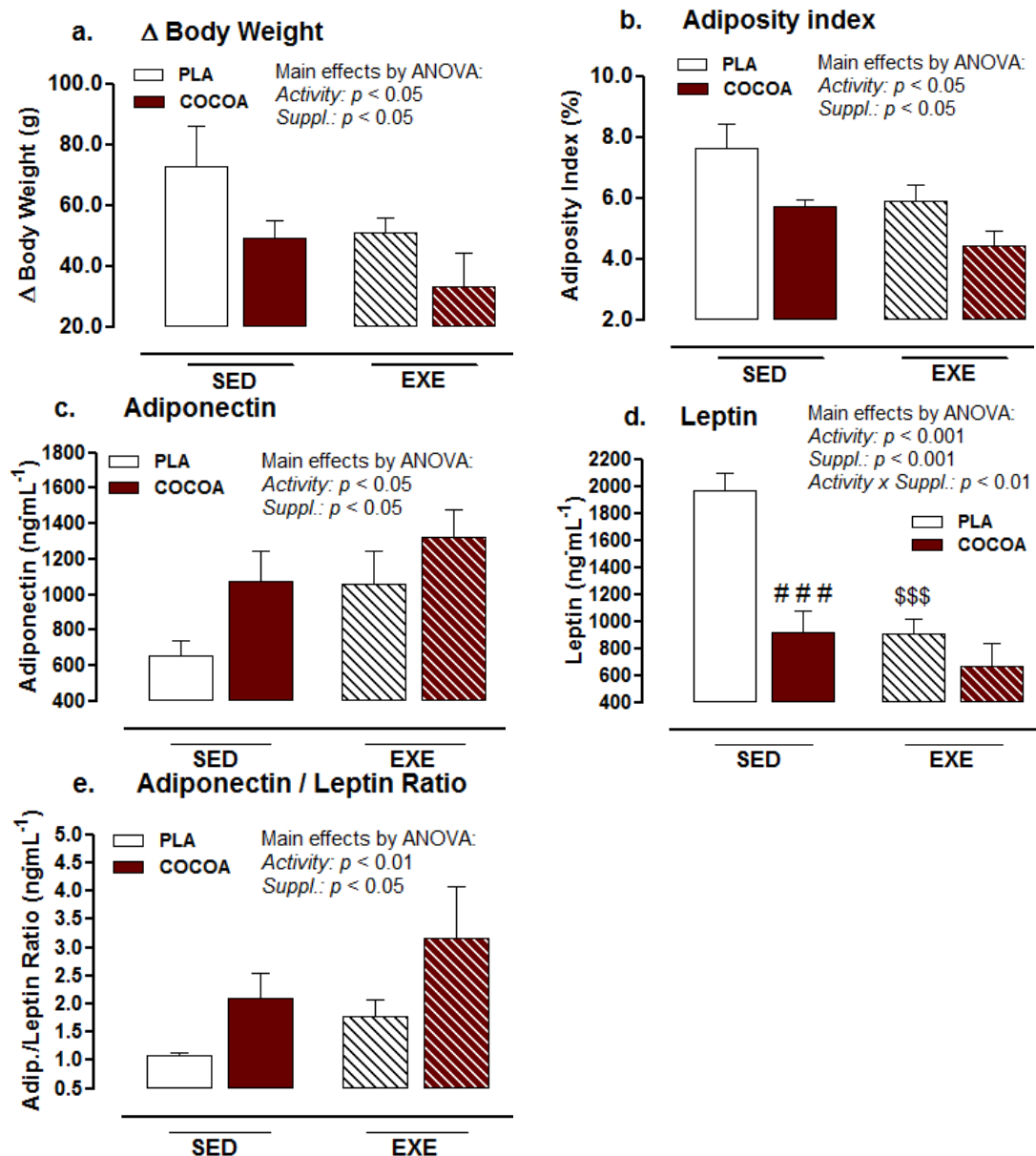


Figura 11. Delta (Δ) da massa corporal (a), índice de adiposidade (b), concentração de adiponectina (c), leptina (d) e razão adiponectina / leptina (e) após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico. Dados estão expressos em média e erro padrão da média. Figuras 11a-e: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos. Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$\$ $p < 0,001$ para PLA.SED vs. PLA.EXE; Análise post hoc para efeito de suplementação: ### $p < 0,001$ para PLA.SED vs. COCOA.SED.

As concentrações de glicose obtidas durante o OGTT estão apresentadas na figura 12. A suplementação crônica dos flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico melhoraram o metabolismo glicêmico durante o OGTT (figura 12a-b). Embora os ratos suplementados com flavanóis tenham apresentado uma atenuação no aumento da concentração de glicose 60 minutos após a gavagem quando comparados aos ratos suplementados com placebo, os ratos treinados apresentaram uma resposta semelhante por até 120 minutos após a exposição à glicose, quando comparados aos ratos sedentários (figura 12a).

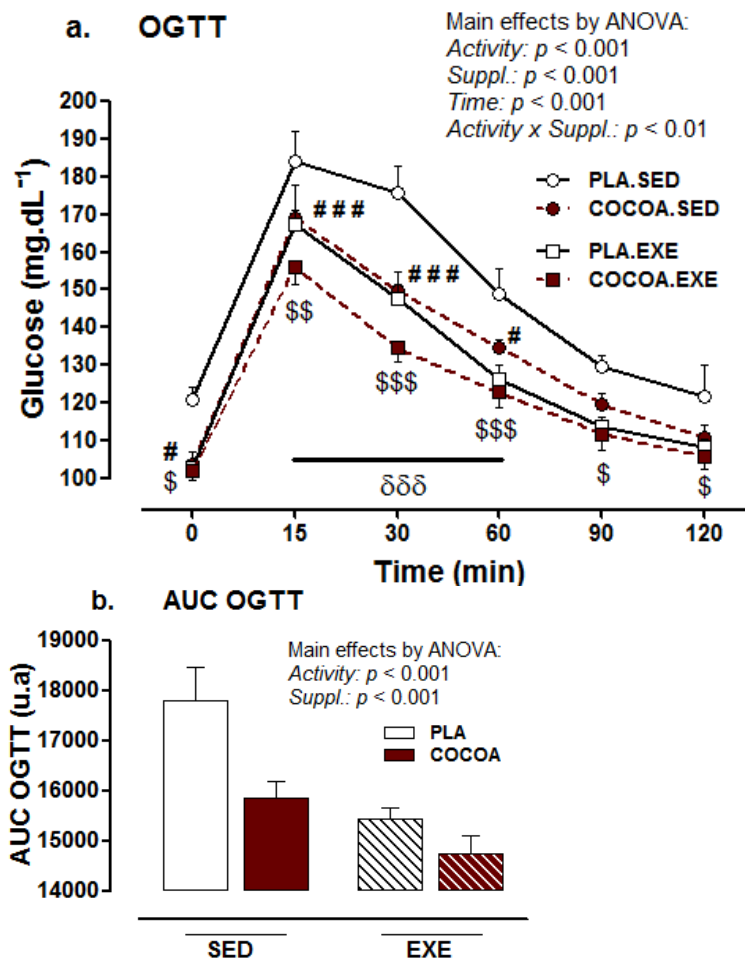


Figure 12. Teste de tolerância oral à glicose OGTT (a) e área sob a curva (b) após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico. Dados estão expressos em média e erro padrão da média.

Figuras 12a-b: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos;

Análise post hoc para efeito de atividade: \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ para PLA.SED vs. PLA.EXE;

Análise post hoc para efeito de suplementação: # $p < 0,05$; #### $p < 0,001$ para PLA.SED vs. COCOA.SED;

Análise post hoc para efeito de tempo: δ $p < 0,05$; $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$, vs. baseline (0).

A suplementação crônica com os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico *per si* reduziram a concentração de glicose, insulina e índice HOMA (figura 13a-c) e, reduziram as concentrações de colesterol total, LDL e triglicerídeos (figura 13d,f-g) após oito semanas de intervenção. Entretanto, a combinação de ambas as intervenções não resultou em efeitos aditivos quando comparadas às intervenções *per si* (Figura 13a-c). Os ratos treinados também apresentaram um aumento significativo nas concentrações de HDL ($p < 0,001$) quando comparados aos ratos sedentários, independente da suplementação dos flavanóis do cacau (Figura 13e).

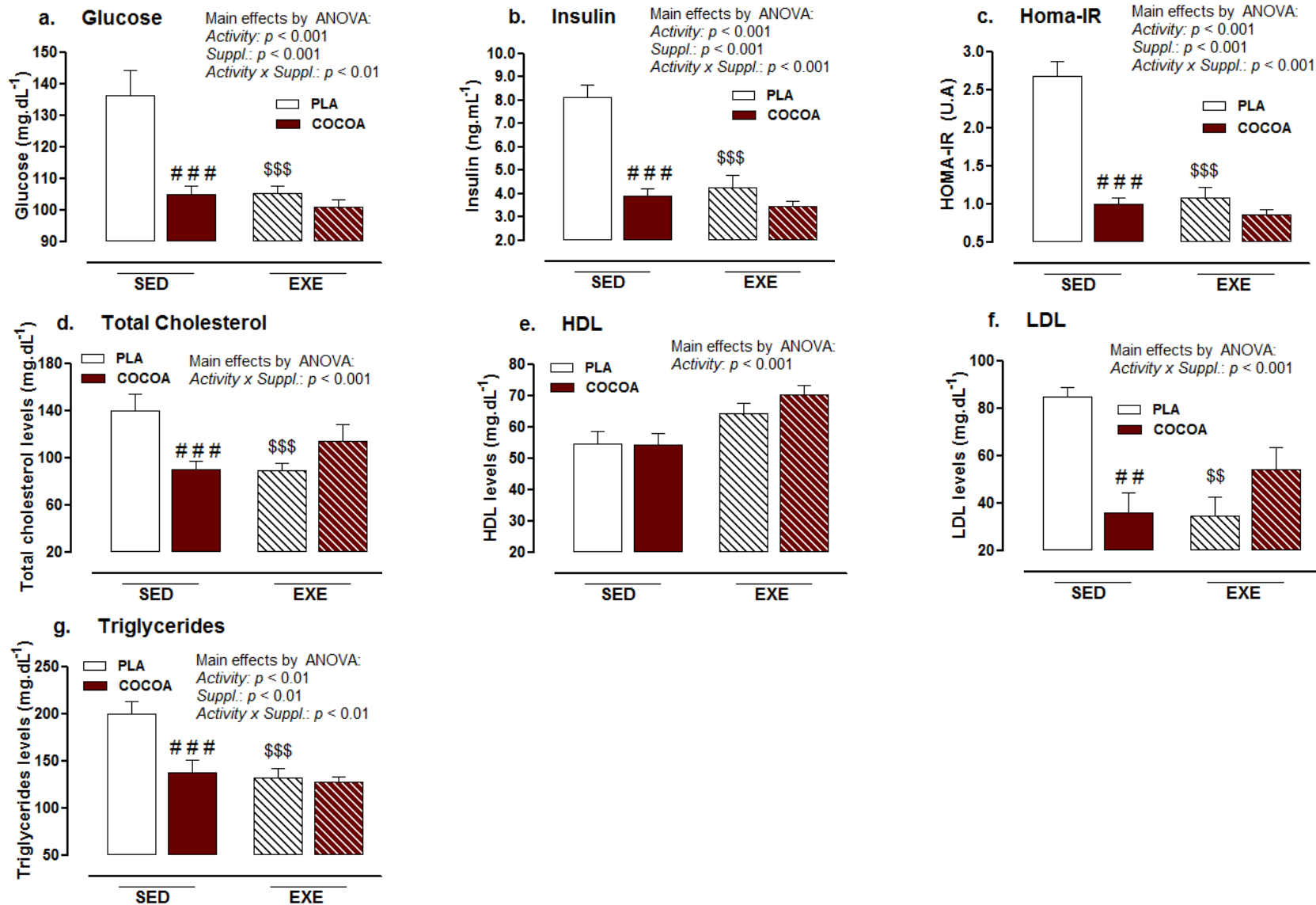


Figura 13. Concentração de glicose e insulina em jejum, índice HOMA e perfil lipídico após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.

Dados estão expressos em média e erro padrão da média.

Figuras 13a-g: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos.

Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ para PLA.SED vs. PLA.EXE

Análise post hoc para efeito de suplementação: ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ para PLA.SED vs. COCOA.SED.

Os ratos treinados apresentaram aumento no desempenho aeróbico, incluindo $VO_{2\text{pico}}$, TTE e V_{peak} quando comparados aos ratos sedentários independente da suplementação com os flavanóis do cacau. Contudo, a suplementação de cacau atenuou a redução do tempo total de exercício e da velocidade pico quando comparados aos ratos suplementados com placebo independentes do treinamento aeróbico (Figura 14a-c).

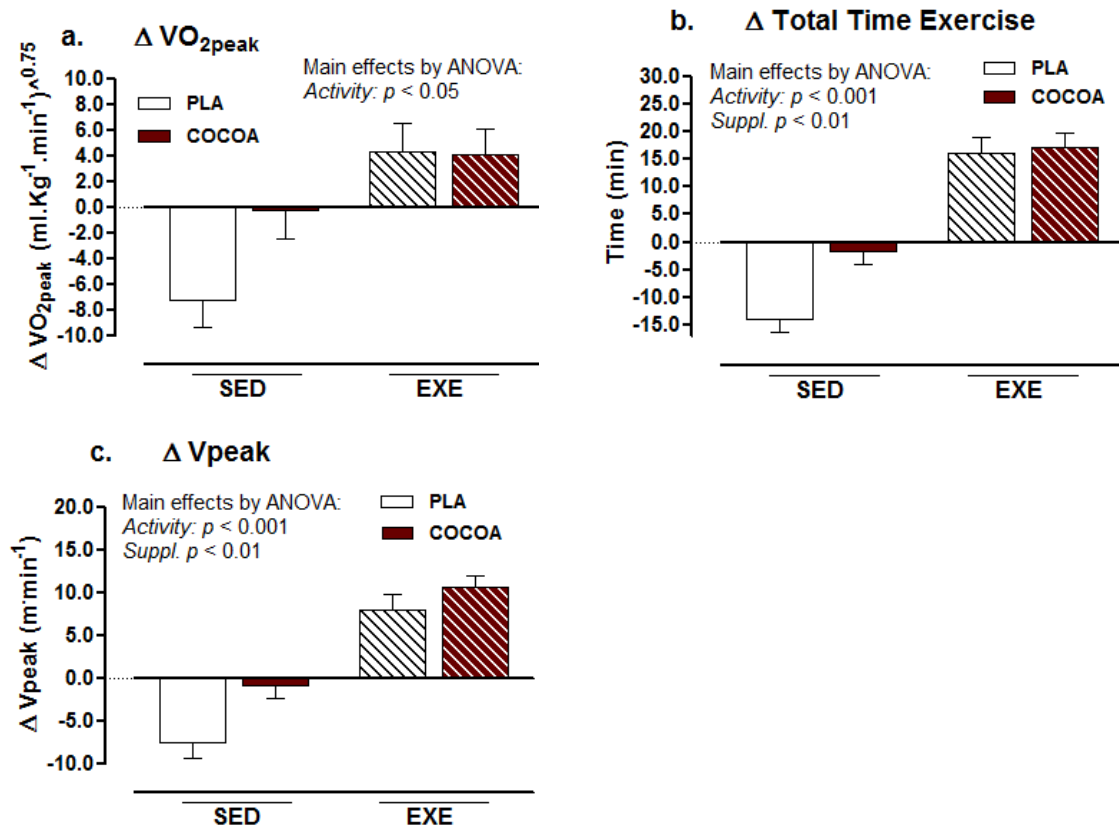


Figura 14. Delta (Δ) do consumo pico de oxigênio pico (a), do tempo total de exercício (b) e da velocidade pico (c) obtidos durante a realização do teste incremental em esteria pré e pós oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.

Figuras 14a,c: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos.

A suplementação com os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico reduziram a concentração de IL-6 nos hepatócitos dos ratos estudados (figura 15a). Além disso, os ratos treinados apresentaram redução nas concentrações de TNF- α e IL-1 β e aumento na concentração de IL-10 no fígado quando comparados aos ratos sedentários independente da suplementação com os flavanóis do cacau (figura 15b-d).

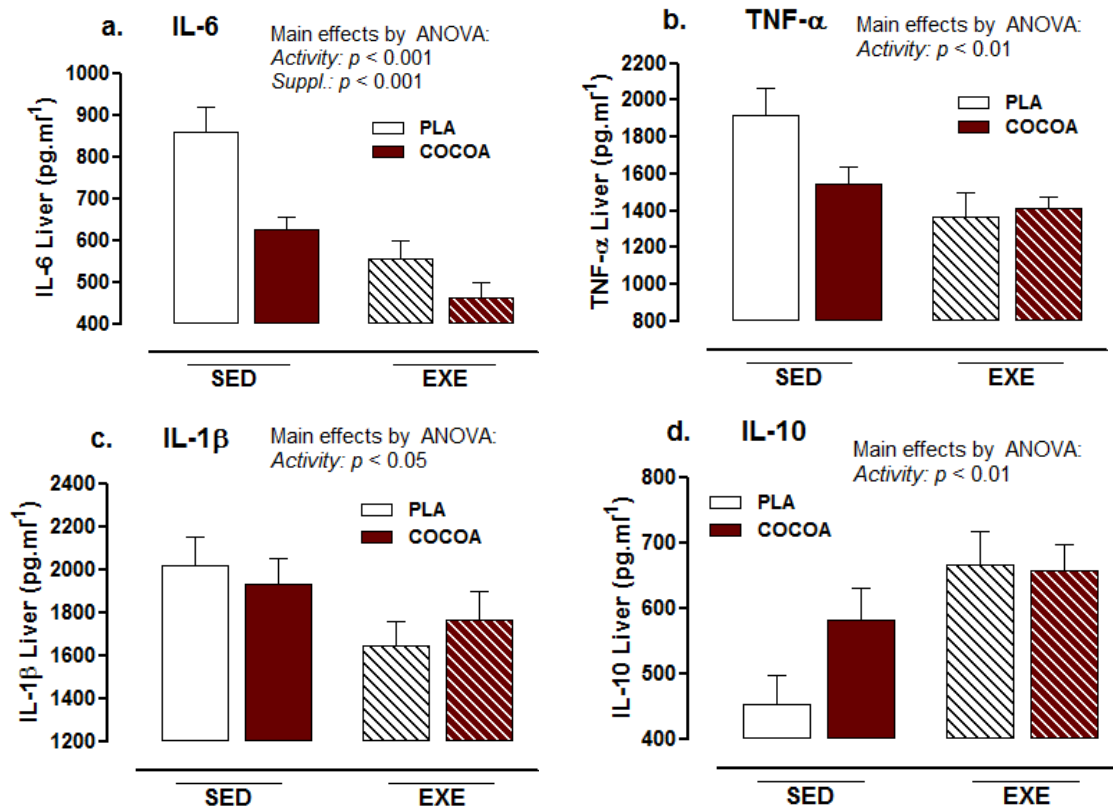


Figura 15. Citocinas de ação pró e anti-inflamatórias tecido hepático dos ratos após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico. Dados estão expressos em média e erro padrão da média.

No músculo esquelético, a suplementação com os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico produziram efeitos semelhantes aos observados no fígado. Assim, o aumento no número de células GLUT4 positivas foi observado nos grupos suplementados com flavanóis ou submetidos ao treinamento (figura 16a-b). Contudo, as intervenções combinadas apresentaram efeito aditivo, resultando em um número significativamente maior de células expressando GLUT4 (figura 16a-b). A suplementação com os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico também reduziram a concentração de TNF- α no músculo gastrocnêmio dos ratos estudados (figura 16d). Além disso, os ratos treinados apresentaram redução na concentração de IL-6 quando comparados aos ratos sedentários independentes da suplementação dos flavanóis do cacau (figura 16c).

A área das ilhotas pancreáticas e as concentrações de citocinas de ação pró e anti-inflamatória no pâncreas estão apresentados na figura 17. Os ratos treinados apresentaram aumento na área das ilhotas de Langerhans quando comparado aos ratos sedentários (figura 17a-b). A suplementação dos flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico *per si* reduziram a concentração de TNF- α (figura 17d) e aumentaram a concentração de IL-10 (figura 17f) no pâncreas, entretanto, sem apresentar efeito aditivo quando combinadas as intervenções. Os

ratos suplementados com flavanóis do cacau também apresetaram redução na concentração de IL-6 no pâncreas quando comparados aos ratos suplementados com placebo independentes do treinamento aeróbico (figura 17c).

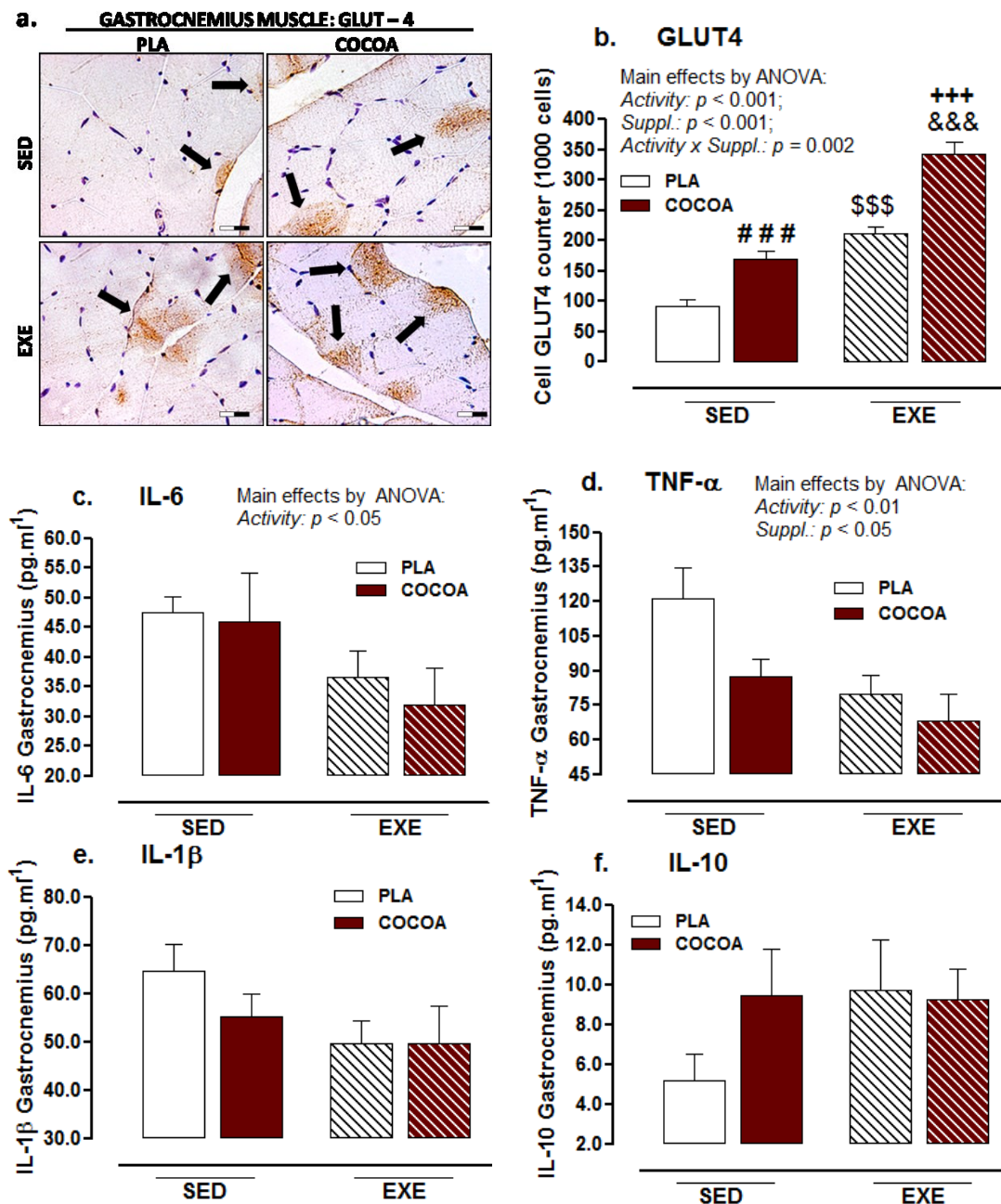


Figura 16. Expressão de GLUT4 e citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no músculo gastrocnêmio dos ratos após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico. Dados estão expressos em média e erro padrão da média. (➔): Expressão de GLUT4; Figuras 16b-f: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos; Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$\$ $p < 0,001$ para PLA.SED vs. PLA.EXE; Análise post hoc para efeito de suplementação: ### $p < 0,001$ para PLA.SED vs. COCOA.SED; Análise post hoc para efeito de atividade: +++: $p < 0,001$ para COCOA.SED vs COCOA.EXE; Análise post hoc para efeito de suplementação: &&&: $p < 0,001$ para PLA.EXE vs COCOA.EXE.

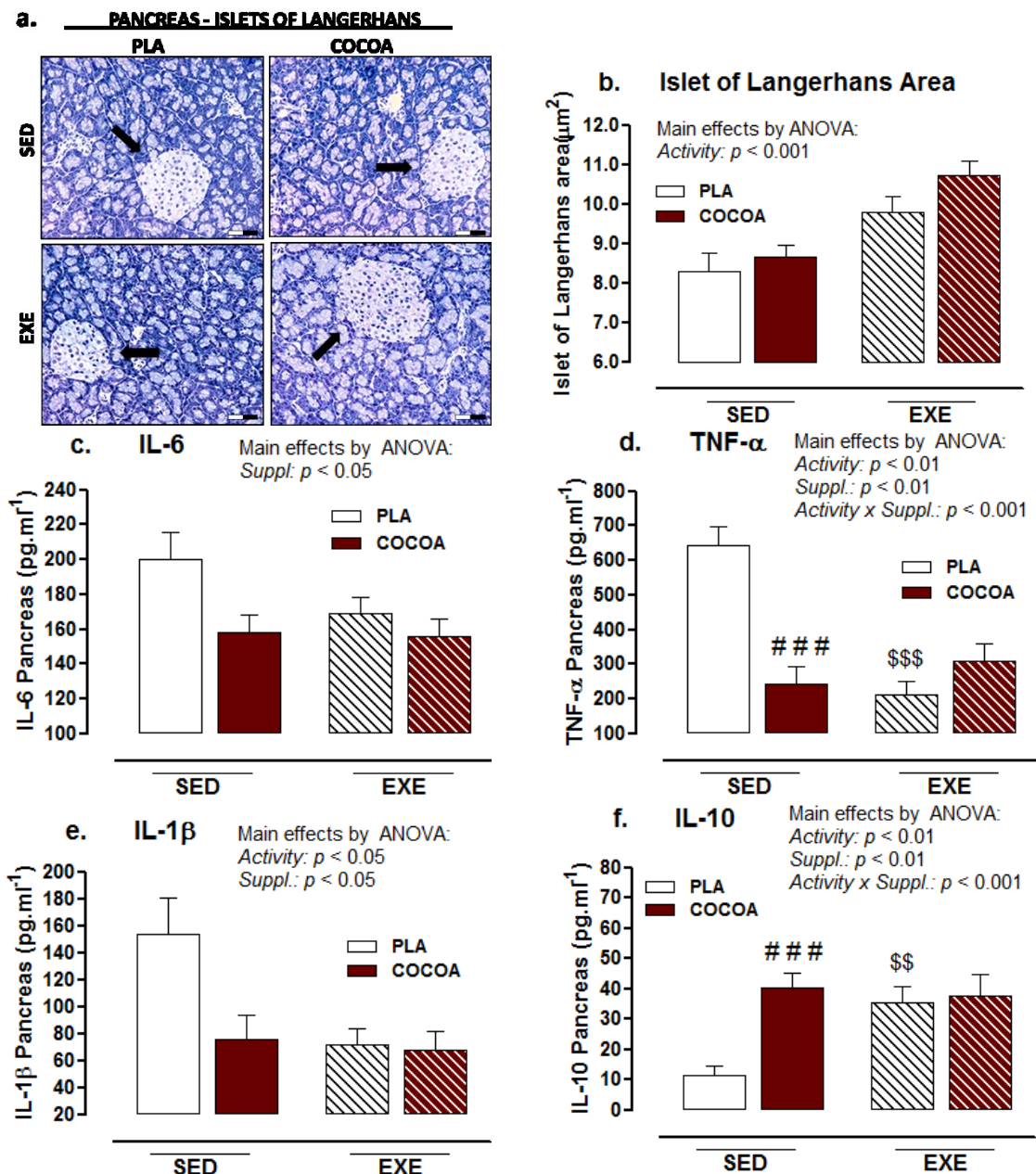


Figura 17. Área das ilhotas de Langerhans e citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no pâncreas dos ratos após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.

Dados estão expressos em média e erro padrão da média;

Figuras 17b-f: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos;

Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ para PLA.SED vs. PLA.EXE;

Análise post hoc para efeito de suplementação: ### $p < 0,001$ para PLA.SED vs. COCOA.SED.

A suplementação com os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico reduziram a área dos adipócitos após oito semanas de intervenção (figura 18a-b). Além disso, a suplementação com os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico *per se* também reduziram a concentração

de IL-6 (figura 18c) e TNF- α (figura 18d) nos adipócitos, entretanto, sem apresentar efeitos aditivos quando combinadas as intervenções.

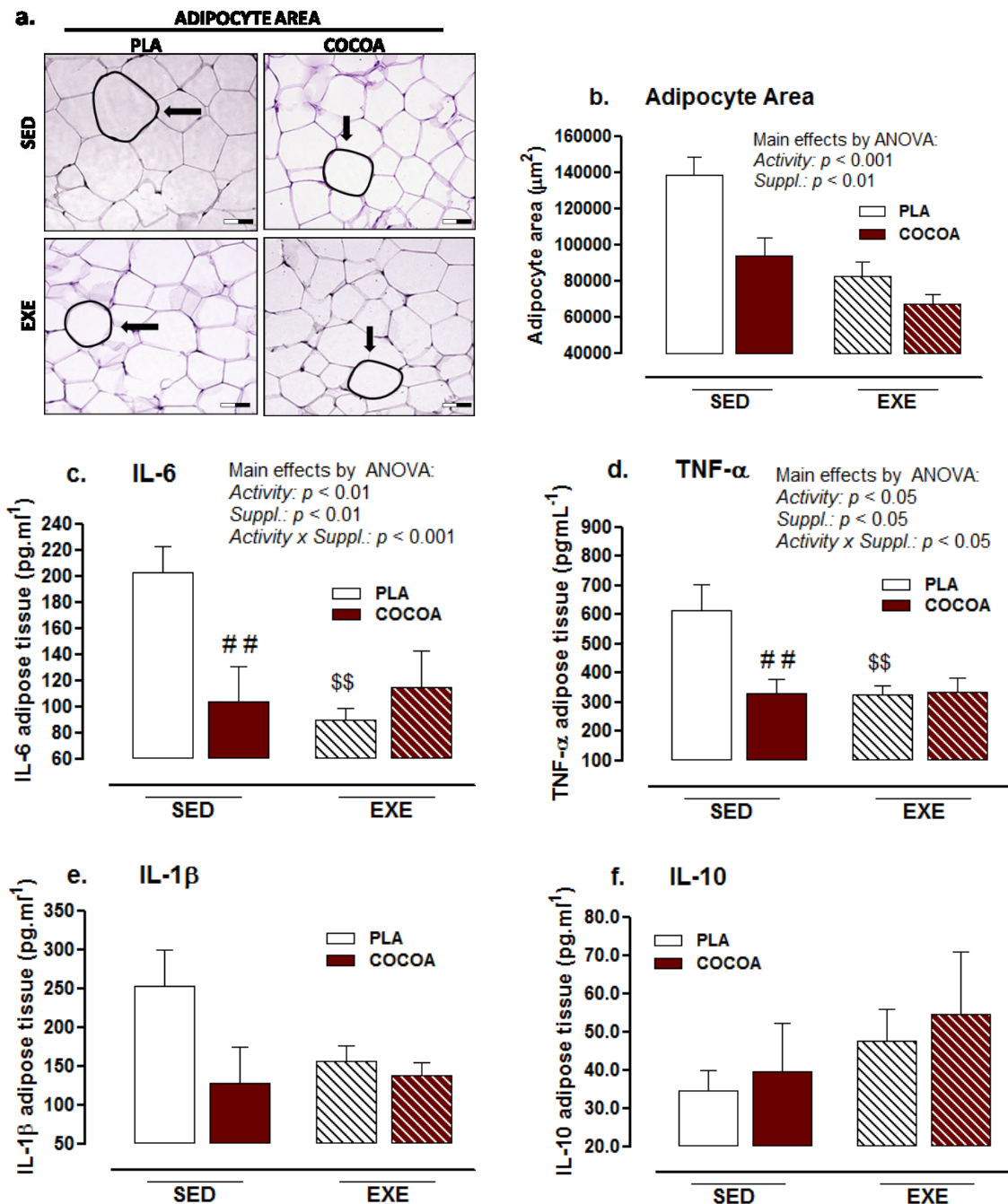


Figura 18. Área dos adipócitos e citocinas de ação pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo epididimal dos ratos após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico.

Dados estão expressos em média e erro padrão da média;

Figuras 19b-f: Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos;

Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$ $p < 0,01$ para PLA.SED vs. PLA.EXE;

Análise post hoc para efeito de suplementação: ## $p < 0,01$ para PLA.SED vs. COCOA.SED.

DISCUSSÃO

A suplementação crônica com os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico realizado a 60%Vpeak durante oito semanas i) atenuaram o ganho de massa corporal e o índice de adiposidade, ii) melhoraram o quadro de intolerância à glicose e o perfil lipídico e iii) melhoraram o *milieu* inflamatório no fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculo esquelético dos ratos resistentes à insulina. Além disso, a suplementação com os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico *per se* aumentaram a expressão de GLUT4 no músculo esquelético, apresentando efeitos aditivos sobre a expressão desta proteína quando as duas intervenções foram combinadas. Em conjunto, os resultados do nosso estudo pela primeira vez mostram a eficácia da suplementação de flavanóis do cacau e do treinamento aeróbico em modular respostas fisiológicas e moleculares-chaves para a prevenção e tratamento da resistência à insulina, indicando que a combinação dessas intervenções pode ser considerada uma estratégia de tratamento não farmacológico eficiente para o DM2.

GLUT4 é uma proteína-chave, determinante para o metabolismo da glicose, sendo primariamente expressa no tecido adiposo e músculo esquelético. É responsável pelo transporte de glicose dependente da ação da insulina através da membrana celular (HUANG; CZECH, 2007; VARGAS; PODDER; SEPULVEDA, 2019). Embora os efeitos do treinamento aeróbico sobre a expressão de GLUT4 já tenham sido demonstrados na literatura (CUNHA *et al.*, 2015; EVANS *et al.*, 2019; STANDFORD *et al.*, 2019), para o melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a mostrar os efeitos aditivos da suplementação de flavanóis do cacau e do treinamento aeróbico no aumento do número de células expressando GLUT4 no músculo esquelético em um quadro de resistência à insulina.

Os mecanismos pelos quais o treinamento aeróbico promove o aumento de GLUT4 no músculo esquelético ainda não foram totalmente elucidados. Entretanto, evidências têm sugerido que o aumento de Ca^{2+} citosólico proveniente do retículo sarcoplasmático em resposta à contração muscular é um fator-chave neste processo. A ativação do complexo cálcio/calmodulina (CaMK) mediado pelo aumento de Ca^{2+} citosólico leva à ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (p38MAPK) que promove a síntese de GLUT4 por meio da ativação do coativador transcricional *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) (WRIGHT, 2007). Embora, no estado basal, MEF2 esteja inibido pelo repressor transcricional *II histone deacetylase* (HDAC) (McGEE; HARGREVES, 2006), o treinamento aeróbico é capaz de induzir a transcrição de GLUT4 por meio da inativação de HDAC4/5 de maneira dependente

de AMPK (NIU *et al.*, 2017). O aumento na fosforilação da AMPK (pAMPK) promove a fosforilação de HDAC5 em serina 259 e 498 inibindo-o, favorecendo assim a ligação do MEF2 ao promotor do gene GLUT4 aumentando portanto sua expressão gênica em diversos tecidos (McGEE *et al.*, 2008).

Neste sentido, o aumento de GLUT4 nos tecidos periféricos e a melhora do metabolismo da glicose mediada pelos flavanóis do cacau, conforme mostrados no presente estudo parecem ser mediados também pelo aumento da fosforilação de APMK (pAMPK). Agudamente, demonstramos, em estudo anterior, que a suplementação com os flavanóis do cacau combinada com o exercício aeróbico submáximo além de aumentar a fosforilação da proteína Akt (pAkt) aumentou significativamente a pAMPK no fígado e no músculo esquelético de ratos resistentes à insulina, promovendo a melhora na captação de glicose independente da concentração plasmática de insulina (MELO *et al.*, dados em submissão). Hepatócitos humanos (HepG2) cultivados em meio enriquecido com flavanóis do cacau aumentaram a expressão de GLUT2 mediada pelo aumento de pAMPK, bem como a sensibilidade à insulina e reduziram a produção hepática de glicose demonstrando assim a ação direta dos compostos bioativos do cacau na ativação de vias de sinalização em tecidos periféricos (CORDERO-HERRERA *et al.*, 2013). Portanto, a ativação de proteínas chaves envolvidas na melhora do metabolismo glicêmico e no aumento de GLUT4 em tecidos periféricos enfatiza a importância da combinação das duas intervenções na prevenção e tratamento e prevenção da resistência à insulina.

No presente estudo, a suplementação com os flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico por 8 semanas promoveram a atenuação do ganho de massa corporal, redução do índice de adiposidade e da área dos adipócitos dos ratos estudados, entretanto, sem apresentar efeitos aditivos quando combinadas as intervenções. Os mecanismos fisiológicos envolvidos na atenuação do ganho de peso corporal e na redução do índice de adiposidade decorrentes da suplementação de flavanóis do cacau e/ou do treinamento aeróbico têm sido associados à dose e a duração total da intervenção (KORD-VARKANEH *et al.*, 2019), à supressão de fatores relacionados à lipogênese, tais como, SREBP-1c e Acetil Co-A Carboxilase (ACC) (CORONADO-CÁCERES *et al.*, 2019), ao estímulo dos fatores envolvidos no gasto energético, incluindo, PPAR- γ , SIRT1, UCP-1 e PGC-1 α (RABADÁN-CHAVES *et al.*, 2016), além da supressão do apetite por meio de diferentes hormônios, tais como aumento de GLP-1 e redução da concentração de grelina (MASSOT *et al.*, 2010; STRAT *et al.*, 2016)

bem como na redução da leptina e aumento na concentração de adiponectina (JARAMILLO FLORES, 2019).

A adiponectina é uma das principais adipocinas sintetizadas e secretadas pelo tecido adiposo e apresenta propriedades anti-inflamatórias, atividade antioxidante e funções cardioprotetoras (FRUHBECK *et al.*, 2018). A redução na concentração circulante de adiponectina observada em condições de obesidade e resistência à insulina tem sido associada à lipotoxicidade e acumulação ectópica de lipídios em diversos tecidos (FORNY-GERMANO *et al.*, 2019). No presente estudo, mostramos que a suplementação com flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico aumentaram a concentração de adiponectina e a razão adiponectina/leptina em ratos resistentes à insulina, favorecendo, portanto, a melhora do controle neuroendócrino da homeostase energética e da disfunção do tecido adiposo, respectivamente. Além disso, nossos resultados também mostraram que a suplementação crônica com flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico *per si* foram eficazes em reduzir as concentrações de leptina nos ratos resistentes à insulina, embora sem apresentar efeitos aditivos quando combinados.

Sintetizada principalmente pelos adipócitos, a leptina age em neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo que expressam pró-opio-melanocortina (POMC) e neuropeptídeo Y (NPY)/proteína relacionada à Agouti (AgPR), aumentando a sensação de saciedade, estimulando o gasto energético e contribuindo portanto, para a homeostase energética e redução do peso corporal (KWON *et al.*, 2016). Entretanto, concentrações elevadas de leptina encontradas em condições de obesidade e resistência à insulina induzem a um estado de resistência à ação deste hormônio em vias hipotalâmicas contribuindo para o desenvolvimento da hiperfagia e aumento de peso corporal (CUI *et al.*, 2017).

A redução da concentração circulante de leptina mediada pelo treinamento aeróbico e pela suplementação com flavanóis do cacau está associada às alterações na composição corporal, especificamente à redução do percentual de gordura corporal e à redução do tamanho dos adipócitos (HARRIS, 2014; FEDEWA *et al.*, 2018; CORONADO-CÁCERES *et al.*, 2019). Além disso, devido os seus efeitos pleiotrópicos em diversos sistemas, tais como, regulação neuroendócrina, homeostase da glicose, modulação do sistema reprodutivo, hematopoiético, inflamação e sistema imune (ABELLA *et al.*, 2017), a redução da concentração circulante de leptina decorrente do treinamento aeróbico e da suplementação com flavanóis pode ter contribuído para a melhora do metabolismo glicêmico, atenuação do

ganho de peso corporal, redução do índice de adiposidade e para a melhora do *milieu* inflamatório em diversos tecidos, enfatizando portanto, a importância das duas intervenções, treinamento aeróbico e suplementação com polifenóis, aqui flavanóis do cacau no controle neuroendócrino em condições de obesidade e resistência à insulina.

No que concerne o perfil inflamatório, o treinamento aeróbico aumentou a concentração de IL-10 e, reduziu as concentrações hepáticas de TNF- α e IL-1 β e de IL-6 no músculo esquelético. Além disso, a suplementação com flavanóis do cacau reduziu a concentração de IL-6 no pâncreas. Entretanto, quando combinadas, as duas intervenções melhoraram o perfil inflamatório no fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculo esquelético dos ratos resistentes à insulina. Embora a suplementação aguda, sub crônica (por 2 semanas) e crônica (> 2 meses) de flavanóis do cacau seja eficaz para reduzir o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, em indivíduos saudáveis treinados, parece não apresentar efeitos em marcadores inflamatórios (MASSARO *et al.*, 2019). Mais ainda, importante ressaltar que seus efeitos associados ao treinamento físico em populações acometidas com doenças crônicas não transmissíveis ainda permanecem desconhecidos. Portanto, para o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar os efeitos da combinação de ambas as intervenções sobre o *milieu* inflamatório em diferentes tecidos periféricos em condições de obesidade e resistência à insulina.

O aumento na concentração de citocinas inflamatórias, tais como, TNF- α , IL-6 e IL-1 β , encontrado em condições de obesidade e resistência à insulina, é responsável por induzir a resistência à ação da insulina em diversos tecidos periféricos, por meio da ativação de diferentes vias de sinalizações intracelulares, incluindo, a fosforilação do receptor do substrato de insulina (IRS-1) em serina, a ativação do fator transcricional nuclear kappa beta (NF- κ) e da via de sinalização c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), além da ativação do fator regulador de interferon e do transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (IRF/STAT) aumentando assim a ativação de macrófagos M1 e consequentemente a inflamação crônica (ZAND *et al.*, 2017). Neste sentido, a redução na concentração de citocinas inflamatórias no fígado, pâncreas, tecido adiposo e no músculo esquelético nos ratos resistentes à insulina decorrentes da suplementação crônica com flavanóis do cacau e do treinamento aeróbico reitera a importância da combinação destas intervenções para a melhora das complicações decorrentes da obesidade e resistência à insulina, aqui no caso, do perfil inflamatório em diversos tecidos periféricos.

Embora não tenhamos explorado todos os mecanismos fisiológicos pelos quais a suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico reduzem a concentração de citocinas inflamatórias, existem evidências têm mostrando que os flavanóis do cacau podem inibir a ativação de fatores transcricionais envolvidos na síntese de citocinas inflamatórias incluindo o fator nuclear kappa β (NF- κ B) e complexo IKK (IKK1/IKK2/IKK β), reduzir a atividade de enzimas chave envolvidas na inflamação, tais como ciclooxigenase 2 (COX-2), bem como, a expressão do fator de adesão vascular VCAM e de moléculas de adesão intercelular (ICAM), além de promover supressão dos sinais sensíveis à redox, tais como a via MAPK (ERK/JNK/p38) (ELLINGER *et al.*, 2016; GOYA *et al.*, 2016; MARTIN *et al.*, 2016). Além disso, esse papel citoprotetor desempenhado pelos flavanóis do cacau foi também observado em células betas pancreáticas, as quais após exposição a esses agentes, apresentaram redução no estresse oxidativo, na apoptose celular e na perda de massa, prevenindo, portanto, o desenvolvimento do DM2 (GHORBANI *et al.*, 2019).

O treinamento aeróbico com intensidade moderada exerce uma função anti-inflamatória eficaz e tem sido amplamente recomendado para pessoas diagnosticadas com diabetes e doenças cardiovasculares (PEDERSEN, 2017). No presente estudo, o treinamento aeróbico além de melhorar o perfil inflamatório, aumentou a área das ilhotas pancreáticas possivelmente pela redução da concentração de IL-1 β e de TNF- α no pâncreas. Foi mostrado que IL-1 β é um importante mediador inflamatório e um marcador de dano celular em células betas pancreáticas, além disso, sua inibição melhorou a disfunção das células beta e a secreção da insulina em indivíduos resistentes à insulina (DONATH; SHOELSON, 2011; WESTWELL-ROPER *et al.*, 2014). O aumento na concentração de TNF- α decorrentes da acumulação de macrófagos M1 no tecido pancreático também contribui para o processo de inflamação, apoptose e disfunção das células betas (EGUCHI *et al.*, 2013). Neste sentido, nossos resultados reforçam a importância do treinamento aeróbico na preservação das ilhotas pancreáticas possivelmente por sua ação anti-inflamatória em condições de obesidade e resistência à insulina.

Como esperado, em nosso estudo o treinamento aeróbico realizado à 60%V_{peak} foi efetivo em aumentar o desempenho aeróbio dos ratos treinados. Já a suplementação com flavanóis do cacau por 8 semanas foi eficaz em atenuar a redução do tempo total de exercício e da velocidade pico, como observado nos ratos suplementados com solução placebo. O aumento da capacidade aeróbia decorrente do treinamento físico com intensidade moderada tem sido associado ao aumento do débito cardíaco, de enzimas oxidativas, do tamanho e

densidade das mitocôndrias, além da melhora na função endotelial e conseqüentemente da aptidão cardiorrespiratória (COLBERG, *et al.*, 2016). Por outro lado, a suplementação crônica com flavanóis do cacau pode aumentar a capacidade antioxidante, a expressão de PGC-1 α e atividade da enzima citrato sintase, contribuindo, portanto para o aumento da biogênese mitocondrial e da capacidade aeróbia, respectivamente (WATANABE *et al.*, 2014; APROTOSOAIIE *et al.*, 2016), o que parece explicar seu efeito na atenuação da redução do tempo total de exercício e da velocidade pico nos animais resistentes à insulina.

Neste sentido, uma vez que a disfunção mitocondrial e a redução da aptidão cardiorrespiratória, encontradas em condições de obesidade e resistência à insulina contribuem para o aumento do risco de mortalidade por doenças cardiovasculares em pessoas diagnosticadas com DM2 (SIVITZ; YOREK, 2010), os resultados do presente estudo apontam que os benefícios sobre o desempenho físico decorrentes da suplementação com flavanóis do cacau e/ou do treinamento aeróbico, se devem a melhora e/ou atenuação da perda da capacidade cardiorrespiratória frente a esta condição de disfunção metabólica. Assim, mais uma vez, a combinação destas duas intervenções, se destaca como uma importante estratégia também para atenuar as complicações metabólicas decorrentes da obesidade e da resistência à insulina.

CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados do presente estudo apontam para a utilização do treinamento aeróbico associado à suplementação crônica com flavanóis do cacau como ferramentas não farmacológicas eficazes na melhora do desempenho físico, metabolismo glicêmico, controle neuroendócrino e perfil lipídico e inflamatório no fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculo esquelético em condições de obesidade e resistência à insulina.

REFERÊNCIAS

- ABELLA, V.; SCOTECE, M.; CONDE, J.; PINO, J.; GOZALEZ-GAY, M.A.; GÓMEZ-REINO, J.J.; MERA, A.; LAGO, F.; GOMEZ, R.; GUALILLO, O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. **Nature Review Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 100-109, 2017. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.209.
- ABRAMOFF, M.D.; MAGALHAES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- APROTOSOAIIE, A.C.; MIRON, A.; TRIFAN, A.; LUCA, V.S.; COSTACHE, I.J. The cardiovascular effects of cocoa polyphenols – an overview. **Diseases**, v. 4, n. 39, p. 1-25, 2016. DOI: 10.3390/diseases4040039.

BRIL, F.; CUSI, K. Basic concepts in insulin resistance and diabetes treatment. **Dermatology and Diabetes**, Springer, Cham, p. 19-35, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-72475-1_3.

COLBERG, S.R.; SIGAL, R.J.; YARDLEY, J.E.; RIDDELL, M.C.; DUNSTAN, D.W.; DEMPSEY, P.C.; HORTON, E.S.; CASTORINO, K.; TATE, D.F. Physical activity/exercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 39, n. 6, p. 2065-2079, 2016. DOI: 10.2337/dc16-1728.

CORDERO-HERRERA, I.; MARTIN, M.A.; BRAVO, L.; GOYA, L.; RAMOS, S. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via Akt and AMPK in HepG2 cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 13, p. 974-985, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200500>.

CORONADO-CÁCERES, L.J.; RABADÁN-CHÁVEZ, G.; QUEVEDO-CORONA, L.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCIA, A.M.; MOJICA, L.; LUGO-CERVANTES, E. Anti-obesity effect of cocoa proteins (*Theobroma cocoa L.*) variety “Criollo” and expression of genes related to the dysfunction of white adipose tissue in high-fat diet-induced obese rats. **Journal of Functional Foods**, v. 62, n. 2019, p. 1-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.106/j.jff.2019.103519>.

CORY, H.; PASSARELLI, S.; SZETO, J.; TAMEZ, M.; MATTEI, J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, n. 21, p. 1-9, 2018. DOI: 10.3389/fnut.2018.00087.

CUI, X.; LÓPEZ, M.; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nature Endocrinology Reviews**, v. 13, n. 2017, p. 338-351, 2017. DOI: 10.1038/nrendo.2016.222.

CUNHA, V.N.; LIMA, M.P.; MOTTA-SANTOS, D.; PESQUERO, J.L.; ANDRADE, R.V.; ALMEIDA, J.A.; ARAUJO, R.C.; CAMPBELL, C.S.G.; LEWIS, J.E.; SIMÕES, H.G. Role of exercise intensity on GLUT4 content, aerobic fitness and fasting plasma glucose in type 2 diabetic mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 33, n. 1, p. 435-442, 2015. DOI: 10.1002/cbf.3128.

CZECH, M.P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Perspective Nature Medicine**, v. 23, n. 7, p. 804-814, 2017. DOI: 10.1038/nm.4350.

DECROIX, L.; SCHUERBEEK, P.V.; TONOLI, C.; CUTSEM, J.V.; SOARES, D.D.; HEYMAN, E.; VANDERHASSELT, T.; VERRELST, R.; RAEYMAEKERS, H.; MEY, J.; MEUSSEN, R. The effects of acute cocoa flavanols intake on the BOLD response and cognitive function in type 1 diabetes: a randomized, placebo-controlled, double-blinded cross-over pilot study. **Psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05306-z>.

DECROIX, L.; TONOLI, C.; SOARES, D.D.; TAGOUGUI, S.; HEYMAN, E.; MEUSSEN, R. Acute cocoa flavanols improves cerebral oxygenation without enhancing executive function at rest or after exercise. **Apply Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 1, n.4, p. 1-8, 2016. DOI: [dx.doi.org/10.1139/apnm-2016-0245](https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0245).

DONATH, M.Y.; SHOELSON, S.N. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature Review Immunology**, v. 11, n. 2, p. 98-107, 2011. DOI: 10.1038/nri2925.

EGUCHI, K., MANABE, I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 152-158, 2013. DOI: 10.1111/dom.12168.

ELLINGER, S.; STEHLE, P. Impact of cocoa consumption on inflammation processes – A critical review of randomized controlled trials. **Nutrients**, v. 8, n. 321, p. 1-26, 2016. DOI: 10.3390/nu8060321.

EVANS, P.L.; McMILLIN, S.L.; WEYRAUCH, L.A.; WITCZAK, C.A. Regulation of skeletal muscle glucose transport and glucose metabolism by exercise training. **Nutrients**, v. 11, n. 2432, p. 1-24, 2019. DOI: 10.3390/nu11102432.

FEDEWA, M.V.; HATHAWAY, E.D.; WARD-RITACO, C.L.; WILLIAMS, T.D.; DOBBS, W.C. The effect of chronic exercise training on leptin: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Sports Medicine**, v. 48, n. 3, p. 1437-1450, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0897-1>.

FLORES, M.E.J. Cocoa flavanols: Natural agents with attenuating effects on metabolic syndrome risk factors. **Nutrients**, v. 11, n. 751, p. 1-32, 2019. DOI: 10.3390/nu1104751.

FORNY-GERMANO, L.; DE FELICE, F.G.; VIEIRA, M.N.N. The role of leptin and adiponectin in obesity-associated cognitive decline and Alzheimer's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 1-19, 2019. DOI: 10.3389/fnins.2018.01027.

FRAGA, C.; CROFT, K.D.; KENNEDY, D.O.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food and Function**, v. 10, n. 1, p. 514-528, 2019. DOI: 10.1039/c8fo01997e.

FRUHBECK, G.; CATALÁ, V.; RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ-AMBROSI, J. Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. **Adipocyte**, v. 7, n. 1, p. 57-62, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/21623945.2017.1402151>.

GHORBANI, A.; RASHIDI, R.; SHAFIEE-NICK, R. Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: a mechanistic review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 11, n. 4, p. 947-957, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.127>.

GOYA, L.; MARTIN, M.A.; SARRIÁ, B.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; BRAVO, L. Effects of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans. **Nutrients**, v. 8, n. 212, p. 1-22, 2016. DOI:10.3390/nu8040212.

HARRIS, R.B.S. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 414-424, 2014. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.05.009.

HASKELL-RAMSAY, C.; SCHIMITT, J.; ACTIS-GORETTA, L. The impact of Epicatechin on human cognition: The role of cerebral blood flow. **Nutrients**, v. 10, n. 986, p. 1-19, 2018. DOI: 10.3390/nu10080986.

HUANG, S.; CZECH, M.P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metabolism Review**, v. 5, n. 1, p. 237-252, 2007. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.03.006.

JARAMILLO FLORES, M.E. Cocoa flavanols: Natural agents with attenuating effects on metabolic syndrome risk factors. **Nutrients**, v. 11, n. 751, p. 1-32, 2019. DOI: 10.3390/nu11040751.

JIMÉNEZ, R.; DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F. Epicatechin: Endothelial function and blood pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2012, n. 60, p. 8823-8830, 2012. DOI: [dx.doi.org/10.1021/jf205370q](https://doi.org/10.1021/jf205370q).

KORD-VARKANEH, H.; GHAEDI, E.; NAZARY-VANANI, A.; MOHAMMADI, H.; SHAB-BIDAR, S. Does cocoa/dark chocolate supplementation have favorable effects on body weight, body mass index, and waist circumference? A systematic review, meta-analysis and dose-response of randomized clinical trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 2346-2362, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1451820>.

KUMAR, A.S.; MAYA, A.G.; SHASTRY, B.A.; VAISHALI, K.; RAVISHANKAR, N.; HAZARI, A.; GUNDMI, S.; JADHAV, R. Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 62, n. 2019, p. 98-103, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2018.11.001>.

KWON, O.; KIM, K.W.; KIM, M.S. Leptin signaling pathways in hypothalamic neurons. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 2016, n. 73, p. 1457-1457, 2016. DOI: [10.1007/s00018-016-2133-1](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2133-1).

LUDOVICI, V.; BARTHELMES, J.; NAGELE, M.P.; ENSELEIT, F.; FERRI, C.; FLAMMER, A.J.; RUSCHITZKA, F.; SUDANO, I. Cocoa, blood pressure, and vascular function. **Frontiers in Nutrition**, v. 4, n. 36, p. 1-12, 2017. DOI: [10.3389/fnut.2017.00036](https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00036).

MARTIN, M.A.; GOYA, L.; RAMOS, S. Antidiabetic actions of cocoa flavanols. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 60, n. 8, p. 1756-1769, 2016. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500961>.

MASKARINEC, G.; JACOBS, S.; BOUSHEY, C.J.; SETIAWAN, V.W.; KOLONEL, L.N.; HAIMAN, C.A.; MARCHAND, L.L. Intake of cocoa products and risk of type-2 diabetes: the multiethnic cohort. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 5, p. 671-678, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0188-9>.

MASSARO, M.; SCODITTI, E.; CARLUCCIO, M.A.; KALTSATOU, A.; CICHELLA, A. Effect of cocoa products and its polyphenolic constituents on exercise performance and exercise-induced muscle damage and inflammation: A review of clinical trials. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 1-15, 2019. DOI: [10.3390/nu11071471](https://doi.org/10.3390/nu11071471).

MASSOT, E.T.; VAN HAARD, P.M.; REHFELD, J.F.; POSTHUMA, E.F.; VAN DER VEER, E.; SCHWEITZER, D.H. Appetite suppression through smelling of dark chocolate correlates with changes in ghrelin in young women. **Regulatory Peptides**, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2010. DOI: [10.1016/j.regpep.2010.01.005](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.01.005).

McGEE, S.L.; DENDEREN, B.J.W.; HOWLETT, K.F.; MOLLICA, J.; SCHERTZER, J. D.; KEMP, B.E.; HARGREAVES, M. AMP-Activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating Histone Deacetylase 5. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 860-867, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2337/db07-0843>.

McGEE, S.L.; HARGREAVES, M. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanism. **Clinical Experimental Pharmacology**, v. 1, n. 33, p. 395-399, 2006. DOI: [10.1111/j.1440-1681.2006.04362.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04362.x).

NIU, Y.; WANG, T.; LIU, S.; YUAN, H.; LI, H.; FU, L. Exercise-induced GLUT4 transcription via inactivation of HDAC4/5 in mouse skeletal muscle in a AMPK α 2-dependent manner. **Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2017, p. 2372-2381, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.001>.

PEDERSEN, B.K. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 1, p. 600-611, 2017. DOI: 10.1111/eci.12781.

PRAKASH, M.; BASAVARAJ, B.V.; MURTHY, K.N.C. Biological functions of Epicatechin: Plant cell to human cell health. **Journal of Functional Foods**, v. 52, n. 2019, p. 14-24, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.021>.

RABADÁN-CHAVES, G.; QUEVEDO-CORONA, L.; GARCIA, A.M.; REYES-MALDONADO, E.; JARAMILLO-FLORES, M.E. Cocoa poder, cocoa extract and Epicatechin attenuate hypercaloric diet-induced obesity through enhanced β -oxidation and energy expenditure in white adipose tissue. **Journal of Functional Foods**, v. 20, n. 2016, p. 54-67, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.016>.

RAMOS, S.; MARTÍN, M.A.; GOYA, L. Effects of cocoa antioxidants in type 2 diabetes mellitus. **Antioxidants**, v. 6, n. 84, p. 1-16, 2017. DOI: 10.3390/antiox6040084.

RAVEENDRAN, A.K.; CHACKO, E.C.; PAPPACHAN, J.M. Non-pharmacological treatment options in the management of diabetes mellitus. **European Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 31-39, 2018. DOI: 10.17925/EE.2018.14.2.31.

RODEN, M.; PETERSEN, K.; SHULMAN, G. Insulin resistance in type 2 diabetes. **Textbook of Diabetes**, v. 5, p. 174-186, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118924853.ch13>.

SIVITZ, W.I.; YOREK, M.A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanism to functional significance and therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 12, n. 4, p. 537-577, 2010. DOI: 10.1089/ars.2009.2531.

STANDFORD, K.L.; GOODYEAR, L.J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. **Advances in Physiology Education**, v. 38, n. 4, p. 308-314, 2014. DOI: 10.1152/advan.00080.2014.

STRAT, K.; DAVY, B.M.; HULVER, M.W.; DAVY, K.P.; NEILSON, A.P. Cocoa increases postprandial GLP-1 response in adults with impaired glucose tolerance. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1, p. 428-5-428-5, 2016.

VARGAS, E.; PODDER, V.; SEPULVEDA, M.A.C. Physiology, glucose transporter type 4 (GLUT4). **StatPearls Publishing**, 2020. PMID: 30726007.

WATANABE, N.; INAGAWA, K.; SHIBATTA, M.; OSAKABE, N. Flavan-3-ol fraction from cocoa powder promotes mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 64, p. 1-8, 2014. DOI: 10.1186/1476-511X-13-64.

WESTWELL-ROPER, C.Y.; EHSES, J.A.; VERCHERE, C.B. Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 β production and β -cell dysfunction. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1698-1711, 2014. DOI: 10.2337/db13-0863.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diabetes**, 2019. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1. Consultado 27/04/2020.

WRIGHT, D.C.. Mechanism of calcium-induced mitochondrial biogenesis and GLUT4 synthesis. **Apply Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 840-845, 2017. DOI: 10.1139/H07-062.

YARIBEYGI, H.; ATKIN, S.L.; SIMENTAL-MENDÍA, L.E.; SAHEBKAR, A. Molecular mechanism by which aerobic exercise induces insulin sensitivity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 2019, n. 234, p. 12385-12392, 2019. DOI: 10.1002/jcp.28066.

ZAND, H.; MORSHEDZADEH, N.; NAGHASHIAN, F. Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**. v. 11, n. 1, p. 307-309, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.03.006>.

5 SÍNTESE DOS ARTIGOS E RELAÇÃO COM OS OBJETIVOS DA TESE

O objetivo geral da tese foi verificar os efeitos agudos e crônicos do exercício físico e da suplementação com flavanóis do cacau sobre o desempenho físico, metabolismo e marcadores inflamatórios em ratos resistentes à insulina. Portanto, para alcançar o objetivo proposto, a presente tese foi estruturada em dois estudos (capítulos) os quais: i) verificou os efeitos agudos (estudo 1); e ii) crônicos (estudo 2) do exercício físico e da suplementação de flavanóis derivado do cacau sobre o desempenho aeróbico, metabolismo e marcadores inflamatórios em ratos Wistar resistentes à insulina.

Os resultados obtidos no estudo preliminar a esta tese demonstramos que o consumo da dieta high-fat associado à bebida rica em frutose por trinta dias foi efetivo em promover alterações metabólicas e teciduais associadas à resistência à insulina, tais como, o aumento da adiposidade e índice HOMA, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia. Além disso, a combinação em curto prazo de high-fat e bebida rica em frutose também promoveu um aumento nas citocinas inflamatórias no fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculo esquelético dos ratos estudados demonstrando assim ser um modelo útil, efetivo e de curto prazo para estudos de resistência à insulina por meio de roedores.

Neste sentido, com o modelo de indução de resistência à insulina em ratos Wistar estabelecido, verificou-se, portanto, os efeitos agudos (estudo 1) e crônicos (estudo 2) do exercício físico e da suplementação de flavanóis do cacau sobre o desempenho físico, metabolismo e parâmetros inflamatórios em ratos resistentes à insulina.

Os resultados encontrados no estudo realizado concomitante a esta tese demonstraram que a suplementação aguda com flavanóis do cacau não alterou o desempenho aeróbico dos ratos estudados mas atenuou a hiperglicemia induzida pelo teste incremental de corrida em esteira nos ratos resistentes à insulina. Neste sentido, o estudo 1 da presente tese, explorou os mediadores teciduais envolvidos na captação de glicose em tecidos periféricos em resposta da suplementação aguda dos flavanóis do cacau prévio à realização do exercício aeróbico submáximo. Os resultados encontrados demonstraram que o exercício aeróbico submáximo e a suplementação com flavanóis do cacau aumentaram a fosforilação de Akt no fígado e no músculo esquelético e melhorou o milieu inflamatório no pâncreas, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Além disso, quando combinadas ambas as intervenções, a suplementação aguda de flavanóis do cacau promoveu efeitos aditivos ao exercício aeróbico na fosforilação da Akt nos hepatócitos dos ratos resistentes à insulina possivelmente

contribuindo para o aumento da captação de glicose e a redução da glicogenólise e gliconeogênese. O exercício aeróbico submáximo e a suplementação com flavanóis do cacau também aumentaram a fosforilação da proteína AMPK no fígado e músculo esquelético, reduziu a expressão gênica de TRB3 e aumentou a expressão de CPT-1 contribuindo para a melhora do metabolismo de glicose e oxidação de lipídios. Portanto, os resultados do estudo 2 demonstraram que a suplementação aguda de flavanóis do cacau associado ao exercício aeróbico submáximo é capaz de promover a ativação de vias de sinalização em diversos tecidos, contribuindo para o aumento na captação e metabolismo da glicose e lipídios e a melhora do *milieu* inflamatório associados à resistência à insulina.

Os efeitos da suplementação crônica de flavanóis do cacau e do treinamento aeróbico sobre o desempenho físico, parâmetros metabólicos e inflamatórios foram investigados no estudo 2. Os resultados demonstraram que a suplementação de flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico realizado a 60%V_{peak} durante oito semanas atenuaram o ganho de massa corporal e o índice de adiposidade, melhorou o quadro de intolerância à glicose e o perfil lipídico e melhorou o *milieu* inflamatório no fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculo esquelético dos ratos resistentes à insulina. Além disso, a suplementação de flavanóis do cacau e o treinamento aeróbico *per se* aumentaram a expressão de GLUT4 no músculo esquelético, apresentando efeitos aditivos quando combinadas ambas as intervenções.

Neste sentido, a presente tese demonstrou, de forma inédita, que os efeitos aditivos da suplementação de flavanóis do cacau ao exercício físico resultaram no aumento e na fosforilação de proteínas chaves envolvidas no metabolismo, tais como GLUT4 e AKT, respectivamente. Adicionalmente, os efeitos da combinação das intervenções foram observados na modulação de parâmetros metabólicos e inflamatórios, normalmente associados à resistência à insulina, nos diferentes tecidos avaliados. Portanto, em conjunto, os resultados obtidos na presente tese demonstraram a eficácia do exercício aeróbico e da suplementação com flavanóis do cacau em melhorar fatores chaves para o tratamento e prevenção da resistência à insulina, sugerindo que a combinação de ambas as intervenções pode ser considerada uma estratégia de tratamento não farmacológico importante para o DM2.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diabetes mellitus é uma doença complexa ocasionada por fatores genéticos, epigenéticos e comportamentais, dentre os quais o sedentarismo e o consumo de dietas hipercalóricas têm sido considerados os principais fatores contribuintes para o aumento da prevalência de obesidade e resistência à insulina na população mundial. Neste sentido, o entendimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos nas complicações metabólicas do diabetes *mellitus* tem sido considerado de grande relevância no cenário atual.

O consumo crônico de dieta high-fat associado à ingestão de bebida rica em frutose por 30 dias foi capaz de promover alterações metabólicas e inflamatórias associadas à resistência à insulina e demonstrou ser um modelo útil e de curto prazo para estudos sobre diabetes *mellitus* por meio roedores. Embora não tenha demonstrado efeitos ergogênicos sobre o desempenho físico, a suplementação aguda de flavanóis do cacau associado ao exercício físico demonstrou ser eficaz para atenuar às complicações metabólicas e inflamatórias decorrentes da resistência à insulina. Cronicamente, ambas as intervenções foram capazes de atenuar o ganho de massa corporal, reduzir o índice de adiposidade, melhorar o metabolismo glicêmico e o perfil lipídico, além de melhorar o milieu inflamatório em diversos tecidos. Quando combinadas, a suplementação aguda de flavanóis do cacau promoveu efeitos aditivos na fosforilação de Akt no fígado e cronicamente promoveu efeitos aditivos no aumento de GLUT4 no músculo esquelético contribuindo para a melhora do metabolismo glicêmico dos ratos resistentes à insulina.

Neste sentido, a presente tese apresentou a padronização de um modelo útil e de curto prazo para induzir resistência à insulina em ratos Wistar, o qual poderá ser utilizado em diversos estudos visando avaliar os efeitos de diferentes intervenções sobre as complicações metabólicas associadas ao DM2. Além disso, demonstrou-se também na presente tese, os mecanismos fisiológicos envolvidos na melhora do metabolismo e parâmetros inflamatórios decorrentes da realização do exercício físico e da suplementação de flavanóis em condições de obesidade e resistência à insulina, sugerindo que a combinação de ambas as intervenções pode ser considerada uma estratégia de tratamento não farmacológico importante para o DM2.

Embora a presente tese tenha demonstrado os efeitos benéficos da suplementação dos flavanóis do cacau sobre o metabolismo e parâmetros inflamatórios em quadros de resistência à insulina, ressalta-se que os efeitos da suplementação dos flavanóis do cacau podem estar associados à dose, ao tempo de absorção e metabolismo pelo organismo, além da quantidade

de catequinas e epicatequinas presentes no cacau. Neste sentido, os efeitos de diferentes doses de flavanóis do cacau sobre o metabolismo e parâmetros inflamatórios associados ao exercício físico em condições de obesidade e resistência à insulina devem ser explorados em pesquisas futuras. Além disso, destaca-se também a importância de que futuros estudos investiguem os efeitos da suplementação de flavanóis do cacau associados aos diferentes tipos de exercícios, tais como, exercício intervalado de alta intensidade, exercício de força muscular e/ou combinado (aeróbico e força na mesma sessão de treinamento). Por fim, ressalta-se a importância de futuros estudos investigarem os efeitos do exercício físico e da suplementação de flavanóis do cacau sobre o sistema nervoso central, especificamente, em parâmetros associados às funções cognitivas e neurogênese hipocampal em condições de obesidade e resistência à insulina.

REFERÊNCIAS

- ABELLA, V.; SCOTECE, M.; CONDE, J.; PINO, J.; GOZALEZ-GAY, M.A.; GÓMEZ-REINO, J.J.; MERA, A.; LAGO, F.; GOMEZ, R.; GUALILLO, O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. **Nature Review Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 100-109, 2017. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.209.
- ABRAMOFF, M.D.; MAGALHAES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ACHARI, A.E.; JAIN, S.K. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1321, p. 1-17, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061321.
- ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetes Medicine**, v. 15, n. 7, p. 539-553, 1998.
- ALBRIGHT, A.; FRANZ, M.; HORNSBY, G.; KRISKA, A.; MARRERO, D.; ULLRICH, I.; VERITY, L. S. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. **Medicine Science and Sports and Exercise**, v. 32, n. 7, p. 1345-1360, 2000.
- ALI, F.; ISMAIL, A.; ESA, N.M.; PEI, C. Cocoa polyphenols treatment ameliorates visceral obesity by reduction lipogenesis and promoting fatty acid oxidation gene in obese rats through interfering with AMPK pathway. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 4, p. 564-575, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400581>.
- ALLGROVE, J.; FARRELL, E.; GLEESON, M.; WILLIAMSON, G.; COOPER, K. Regular dark chocolate consumption's reduction of oxidative stress and increase of free-fatty-acid mobilization in response to prolonged cycling. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 113-123, 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION – ADA. Diagnosis and Classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 581-590, 2014.
- APROTOSOAIÉ, A.C.; MIRON, A.; TRIFAN, A.; LUCA, V.S.; COSTACHE, I.J. The cardiovascular effects of cocoa polyphenols – an overview. **Diseases**, v. 4, n. 39, p. 1-25, 2016. DOI: 10.3390/diseases4040039.
- ARKAN, M. C.; HEVENER, A. L.; GRETEN, F. R.; MAEDA, S.; LI, Z. W.; LONG, J. M.; WYNshaw-BORRIS, A.; POLI, G.; OLEFSKY, J.; KARIN, M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 191-198, 2005.
- BALAKUMAR, M.; RAJI, L.; PRABHU, D.; SATHISHKUMAR, C.; PRABU, P.; MOHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, M. High fructose diet is a detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 423, n. 1, p. 93-104, 2016.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BARBOSA-DA-SILA, S.; SARMENTO, I. B.; BARGUT, T. C. L.; SOUZA-MELLO, V.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Animal models of nutritional induction of type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Morphology**, v. 32, n. 1, p. 279-293, 2014.

BAYNARD, T.; FRANKLIN, R. M.; GOULOPOLOU, S.; CARHART, R. Jr.; KANALEY, J. A. Effect of a single vs multiple bouts of exercise on glucose control in women with type 2 diabetes. **Metabolism**, v. 54, n. 8, p. 989-994, 2005.

BENATTI, F.B.; PEDERSEN, B.K. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases-myokine regulation. **Nature Review Rheumatology**, v. 11, n. 2, p. 86-97, 2015. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.193.

BERHANE, F.; FITE, A.; DABOUL, N.; AL-JANABI, W.; MSALLATY, Z.; CARUSO, M.; LEWIS, M.K.; YI, Z.; DIAMOND, M.P.; ABOU-SAMRA, A.B; SEYOUM, B. Plasma lactate levels increase during hyperinsulinemic euglycemic clamp and oral glucose tolerance test. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, p. 1-7, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/102054>.

BERRY, N. M.; DAVISON, K.; COATES, A. M.; BUCKLEY, J. D.; HOWE, P. R. C. Impact of cocoa flavanol consumption on blood pressure responsiveness to exercise. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 7, p. 1480-1484, 2010.

BETTAIEB, A.; VAZQUEZ-PRIETO, M. A.; RODRIGUEZ-LANZI, C.; MIATELLO, R. -(E)-Epicatechin mitigates high-fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress. **Free Radical and Biology Medicine**, v. 72, n. 4, p. 247-256, 2014.

BEUREL, E.; GRIECO, S.F.; JOPE, R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions and diseases. **Pharmacology & Therapeutic**, v. 2014, n. 148, p. 114-131, 2015. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.

BISSON, J. F.; NEJDI, A.; ROZAN, P.; HIDALGO, S.; LALONDE, R.; MESSAOUDI, M. Effects of long-term administration of a cocoa polyphenolic extract (Acticoa Powder) on cognitive performances in aged rats. **British Journal of Nutrition**, v. 2008, n. 100, p. 94-101, 2008.

BLÁZQUEZ, E.; VELÁZQUEZ, E.; HURTADO-CARNEIRO, V.; RUIZ-ALBUSAC, J. M. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Frontier Endocrinology**, v. 5, n. 4, p. 161, 2014.

BLUHER, M.; MANTZOROS, C. S. From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. **Metabolism**, v. 64, n. 2015, p. 131-145, 2015.

BOCARSLY, M. E.; POWELL, E. S.; AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. **Pharmacology Biochemistry and Behavioral**, v. 97, n. 8, p. 101-106, 2010.

BOCARSLY, M. E.; POWELL, E. S.; AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and

triglyceride levels. **Pharmacology Biochemistry and Behavioral**, v. 97, n. 8, p. 101–106, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de atenção básica, 160p. 2013.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRICKMAN, A. M.; KHAN, U. A.; PROVEZANO, F. A.; YEUNG, L. K.; SUZUKI, W.; SCHROETER, H.; WALL, M.; SLOAN, R. P.; SMALL, S. A. Enhancing dentate gyrus function with dietary flavanols improves cognition in older adults. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 1798-1803, 2014.

BRIL, F.; CUSI, K. Basic concepts in insulin resistance and diabetes treatment. **Dermatology and Diabetes**, Springer, Cham, p. 19-35, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-72475-1_3.

BROOKS, G.A.; Importance of the “crossover” concept in exercise metabolism. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 1997, n. 24, p. 889-895, 1997.

CHENG, L.; CHENG, L.; WANG, H.; LIANG, F. Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 1-9, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/508409>.

CHOI, R.H.; McCONAHAY, A.; SILVESTRE, J.G.; MORISCOT, A.S.; CARSON, J.A.; KOH, H.J. TRB3 regulates skeletal muscle mass in food deprivation-induced atrophy. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 4, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1096/fj.201802145RR>.

COHEN, R. A.; TONG, X. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. **Journal of Cardiovascular and Pharmacological**, v. 1, n. 55, p. 308-316, 2010.

COLBERG, S. R.; SIGAL, R. J.; FERNHALL, B.; REGENSTEINER, J. G.; BLISSMER, B. J.; RUBIN, R. R.; CHASAN-TABER, L.; ALBRIGHT, A. L.; BRAUN, B. Exercise and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, n. 12, p. 147-167, 2010.

COLBERG, S.R.; SIGAL, R.J.; YARDLEY, J.E.; RIDDELL, M.C.; DUNSTAN, D.W.; DEMPSEY, P.C.; HORTON, E.S.; CASTORINO, K.; TATE, D.F. Physical activity/exercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 39, n. 6, p. 2065-2079, 2016. DOI: 10.2337/dc16-1728.

COOPER, K. A.; DONOVAN, J. L.; WATERHOUSE, A. L.; WILLIAMSON, G. Cocoa and health: a decade of research. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 1, p. 1-11, 2008.

CORDEIRO-HERREIRA, I.; MARTÍN, M.A.; BRAVO, L.; GOYA, L.; RAMOS, S. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via AKT and AMPK in HepG2 cells. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 2013, n. 57, p. 974-985, 2013. DOI 10.1002/mnfr.201200500.

CORDERO-HERRERA, I.; MARTIN, M. A.; FERNANDEZ-MILLAN, E.; ALVAREZ, C. Cocoa and cocoa flavanol epicatechin improve hepatic lipid metabolism in *in vivo* and *in vitro* models. Role of PKC. **Journal of Functional and Foods**, v. 17, n. 4, p. 761-773, 2015.

CORDERO-HERRERA, I.; MARTIN, M.A.; BRAVO, L.; GOYA, L.; RAMOS, S. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via Akt and AMPK in HepG2 cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 13, p. 974-985, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200500>.

CORONADO-CÁCERES, L.J.; RABADÁN-CHÁVEZ, G.; QUEVEDO-CORONA, L.; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; GARCIA, A.M.; MOJICA, L.; LUGO-CERVANTES, E. Anti-obesity effect of cocoa proteins (*Theobroma cocoa L.*) variety “Criollo” and expression of genes related to the dysfunction of white adipose tissue in high-fat diet-induced obese rats. **Journal of Functional Foods**, v. 62, n. 2019, p. 1-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1066/j.jff.2019.103519>.

CORT, K. W. D.; PERRAR, I.; PENCZNSKI, K. J.; SCHWINGSHACKL, L.; HERDER, C.; BUYKEN, A. E. Effect of dietary sugar intake on biomarkers of subclinical inflammation: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. **Nutrients**, v. 10, n. 606, p. 1-20, 2018.

CORY, H.; PASSARELLI, S.; SZETO, J.; TAMEZ, M.; MATTEI, J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, n. 21, p. 1-9, 2018. DOI: [10.3389/fnut.2018.00087](https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087).

CRAWFORD, S.O.; HOOGEVEEN, R.C.; BRANCATI, F.L.; ASTOR, B.C.; BALLANTYNE, C.M.; SCHIMIDT, M.I.; YOUNG, F.H. Association of blood lactate with type 2 diabetes: the Atherosclerosis risk communities carotid MRI study. **International Journal of Epidemiology**, v. 2010, n. 39, p. 1647-1655, 2010. DOI: [10.1093/ije/dyq126](https://doi.org/10.1093/ije/dyq126).

CUI, X.; LÓPEZ, M.; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nature Endocrinology Reviews**, v. 13, n. 2017, p. 338-351, 2017. DOI: [10.1038/nrendo.2016.222](https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.222).

CUNHA, V.N.; LIMA, M.P.; MOTTA-SANTOS, D.; PESQUERO, J.L.; ANDRADE, R.V.; ALMEIDA, J.A.; ARAUJO, R.C.; CAMPBELL, C.S.G.; LEWIS, J.E.; SIMÕES, H.G. Role of exercise intensity on GLUT4 content, aerobic fitness and fasting plasma glucose in type 2 diabetic mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 33, n. 1, p. 435-442, 2015. DOI: [10.1002/cbf.3128](https://doi.org/10.1002/cbf.3128).

CURTIS, P.J.; SAMPSON, M.; POTTER, J.; DHATARIYA, K.; KROON, P.A.; CASSIDY, A. Chronic ingestion of flavan3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes: a 1year, double-blind, randomized, controlled trial. **Diabetes Care**, v. 35, n. 7, p. 226–232, 2012.

CZECH, M.P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Perspective Nature Medicine**, v. 23, n. 7, p. 804-814, 2017. DOI: [10.1038/nm.4350](https://doi.org/10.1038/nm.4350).

DA SILVA, A. S.; PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; OLIVEIRA, A. G.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 9, p. 2180–2188, 2010.

DAVISON, G.; CALLISTER, R.; WILLIAMSON, G.; COOPER, K.A.; GLEESON, M. The effect acute pre-exercise dark chocolate consumption on plasma antioxidant status, oxidative stress and immunoendocrine responses to prolonged exercise. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 69-79, 2012. DOI: 10.1007/s00394-011-0193-4.

De ALVARO, C.; TERUEL, T.; HERNANDEZ, R.; LORENZO, M. Tumor necrosis factor α produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor κ B kinase in a p38 MAPK-dependent manner. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 279, n.7, p. 17070–17078, 2004.

De FRONZO, R. AL.; FERRANNINI, E.; GROOP, L.; HENRY, R. R.; HERMAN, W. H.; HOLST, J. J.; HU, F. B.; KAHN, C. R.; RAZ, I.; SHULMAN, G. I.; SIMONSON, D. C.; TESTA, M. A.; WEISS, R. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Prime**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2015. DOI: 10.1038/nrdp.2015.19.

DE VRIESE, A. S.; VERBEUREN, T. J.; VOORDE, J. H.; LAMEIRE, N. H.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction in diabetes. **British Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 130, p. 963-974, 2000.

DECROIX, L.; SOARES, D.D.; MEEUSEN, R.; HEYMAN, E.; TONOLI, C. Cocoa flavanols supplementation and exercise: A systematic review. **Sports Medicine**, n. 48, v. 4, p. 867-892, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0849-1>.

DEEDS, M. C.; ANDERSON, J. M.; ARMSTRONG, A. S.; GASTINEAU, D. A.; HIDDINGA, H. J.; JAHANGIR, A.; EBERHARDT, N. L.; KUDVA, Y. C. Single dose streptozotocin induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratoy Animal**, v. 45, n. 3, p. 131-140, 2011.

DEFRONZO, R. AL.; FERRANNINI, E.; GROOP, L.; HENRY, R. R.; HERMAN, W. H.; HOLST, J. J.; HU, F. B.; KAHN, C. R.; RAZ, I.; SHULMAN, G. I.; SIMONSON, D. C.; TESTA, M. A.; WEISS, R. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Prime**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2015.

DESHPANDE, A. D.; HARRIS-HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. **Journal of the American Physical Therapy Association**, v. 88, n. 11, p. 1254-1264, 2008.

DESIDERI, G.; KWIK-URIBE, C.; GRASSI, D.; NECOZIONE, S.; GHIADONI, L.; RAFFAELE, A.; FERRI, L.; BOCALE, R.; LECHIARA, M. C.; MARINI, C.; FERRI, C. Benefits in cognitive function, blood pressure and insulin resistance through cocoa flavanol consumption in elderly subjects with mild cognitive impairment: the Cocoa, cognition and aging (CoCoA) study. **Hypertension**, v. 60, n. 3, p. 794-801, 2012.

DONATH, M.Y.; SHOELSON, S.N. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature Review Immunology**, v. 11, n. 2, p. 98-107, 2011. DOI: 10.1038/nri2925.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Polyphenols in cocoa and derivatives: factors of variation and health effects. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v. 14, n. 3, p. 181-201, 2011.

EGUCHI, K., MANABE, I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 152-158, 2013. DOI: 10.1111/dom.12168.

- ELLINGER, S.; STEHLE, P. Impact of cocoa consumption on inflammation processes – A critical review of randomized controlled trials. **Nutrients**, v. 8, n. 321, p. 1-26, 2016. DOI: 10.3390/nu8060321.
- EVANS, P.L.; McMILLIN, S.L.; WEYRAUCH, L.A.; WITCZAK, C.A. Regulation of skeletal muscle glucose transport and glucose metabolism by exercise training. **Nutrients**, v. 11, n. 2432, p. 1-24, 2019. DOI: 10.3390/nu11102432.
- FARAH, C.; MICHEL, L.Y.M.; BALLIGAND, J.L. Nitric oxide signaling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 1, p. 292-316, 2018. DOI: 10.138/nrcardio.2017.224.
- FEDEWA, M.V.; HATHAWAY, E.D.; WARD-RITACO, C.L.; WILLIAMS, T.D.; DOBBS, W.C. The effect of chronic exercise training on leptin: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Sports Medicine**, v. 48, n. 3, p. 1437-1450, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0897-1>.
- FERNANDEZ-MILLAN, E.; CORDERO-HERRERA, I.; RAMOS, S.; ESCRIVA, F. Cocoa-rich diet attenuates beta cell mass loss and function in young Zucker diabetic fatty rats by preventing oxidative stress and beta cell apoptosis. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 9, p. 820-824, 2015.
- FERRANNINI, E. The stunned β cell: a brief history. **Cellular and Metabolism**, v. 11, n. 4, p. 349–352, 2010.
- FLANAGAN, A. M.; BROWN, J. L.; SANTIAGO, C. A.; AAD, P. Y.; SPICER, L. J.; SPICER, M. T. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 19, n. 8, p. 505-513, 2008.
- FLORES, M. B.; FERNANDES, M. F.; ROPELLE, E. R.; FARIA, M. C.; UENO, M.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J.; CARVALHEIRA, J. B. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 2554–2561, 2006.
- FLORES, M.E.J. Cocoa flavanols: Natural agentes with attenuating effects on metabolic syndrome risk factors. **Nutrients**, v. 11, n. 751, p. 1-32, 2019. DOI: 10.3390/nu1104751.
- FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.
- FORETZ, M.; EVEN, P.C.; VIOLLET, B. AMPK activation reduces hepatic lipid content by increasing fat oxidation in vivo. **International Journal Molecular Science**, v. 2018, n. 19, p. 1-14, 2018. DOI:10.3390/ijms19092826.
- FORNY-GERMANO, L.; DE FELICE, F.G.; VIEIRA, M.N.N. The role of leptin and adiponectin in obesity-associated cognitive decline and Alzheimer's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. 6, p. 1-19, 2019. DOI: 10.3389/fnins.2018.01027.
- FRAGA, C.; CROFT, K.D.; KENNEDY, D.O.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food and Function**, v. 10, n. 1, p. 514-528, 2019. DOI: 10.1039/c8fo01997e.
- FRAGA, C.G.; LITTERIO, M.C.; PRINCE, P.D.; CALABRÓ, V.; PIOTRKOWSKI, B.; GALLEANO, M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure.

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, v. 48, n. 1, p. 63-67, 2011. DOI: 10.3164/jcbn.11010FR.

FRANCIS, S. T.; HEAD, K.; MORRIS, P. G.; MACDONALD, I. A. The effect of flavanol-rich on the fMRI responses to a cognitive task in health young people. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 47, n. 2, p. 215-220, 2006.

FRUHBECK, G.; CATALÁ, V.; RODRÍGUEZ, A.; GÓMEZ-AMBROSI, J. Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. **Adipocyte**, v. 7, n. 1, p. 57-62, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/21623945.2017.1402151>.

GERICH, J. E.; MEYER, C.; WOERLE, H. J.; STUMVOLL, M. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. **Diabetes Care**, v. 24, n. 3, p. 382–391, 2001.

GHORBANI, A.; RASHIDI, R.; SHAFIEE-NICK, R. Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: a mechanistic review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 11, n. 4, p. 947-957, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.127>.

GHORBANZADEH, V.; MOHAMMADI, M.; DARIUSHNEJAD, H.; CHODARI, L.; MOHADDES, G. Effects of crocin and voluntary exercise, alone or combined, on heart VEGF-A and HOMA-IR of HFD/STZ induced type 2 diabetic rats. **Journal of Endocrinology Invest**, v. 1, n. 2, p. 1179-1186, 2016.

GOYA, L.; MARTIN, M.A.; SARRIÁ, B.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; BRAVO, L. Effects of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans. **Nutrients**, v. 8, n. 212, p. 1-22, 2016. DOI:10.3390/nu8040212.

GUILHERME, A.; VIRBASISUS, J. V.; PURI, V.; CZECH, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 4, p. 367–377, 2008.

HARDIE, D.G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. **Genes & Development**, v. 2011, n. 25, p. 1895–1908, 2011. DOI:10.1101/gad.17420111.

HARRIS, R.B.S. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 414-424, 2014. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.05.009.

HASKELL-RAMSAY, C.; SCHIMMITT, J.; ACTIS-GORETTA, L. The impact of Epicatechin on human cognition: The role of cerebral blood flow. **Nutrients**, v. 10, n. 986, p. 1-19, 2018. DOI: 10.3390/nu10080986.

HEISS, C.; FINIS, D.; KLEINBONGARD, P.; HOFFMANN, A.; RASSAF, T.; KELM, M.; SIES, H. Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. **Journal of Cardiovascular and Pharmacology**, v. 49, n. 5, p. 74–80, 2007.

HEISS, C.; SCHROETER, H.; BALZER, J.; KLEINBONGARD, P.; MATERN, S.; SIES, H.; KELM, M. Endothelial function, nitric oxide and cocoa flavanols. **Journal of Cardiovascular and Pharmacology**, v. 47, n. 2, p. s128-s135, 2006.

HERMANN, F.; SPIEKER, L.; RUSCHITZKA, F.; SUDANO, I.; HERMANN, M.; BINGGELI, C.; LUSCHER, T. F.; RIENSEN, W.; NOLL, G.; CORTI, R. Dark chocolate

improves endothelial and platelet function. **Heart**, v. 92, n. 3, p. 119–120, 2006. DOI: 10.1136/hrt.2005.063362.

HESSELINK, M.C.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V.; SCHRAUWEN, P. Skeletal muscle mitochondria as target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, p. 633-645, 2016. DOI: 10.1038/nrendo.2016.104.

HOENE, M.; LEHMANN, R.; HENNIGE, A. M.; POHL, A. K.; HARING, H. U.; SCHLEICHER, E. D.; WEIGERT, C. Acute regulation of metabolic genes and insulin receptor substrates in the liver of mice by one single bout of treadmill exercise. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 10, p. 241–252, 2009.

HOOPER, L.; KAY, C.; ABDELHAMID, A.; KROON, P. A.; COHN, J. S.; RIMM, E. B.; CASSIDY, A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **American Journal of Clinical and Nutrition**, v. 95, n. 7, p. 740-751, 2012.

HORST, K. W.; SCHENE, M. R.; HOLMAN, R.; ROMIJN, J.; SERLIE, M. J. Effect of fructose consumption on insulin sensitivity in non diabetic subjects: A systematic review and meta-analysis of diet-intervention trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 6, p. 1562-1576, 2016.

HOWARTH, F. C.; ALKURY, L.; SMAIL, M.; QURESHI, M. A.; SYDORENKO, V.; SHMYGOL, A.; OZ, M.; SINGH, J. Effect of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus on contraction and calcium transport in rat. **JSM Diabetology and Management**, v. 2, n. 1, p. 1-18, 2017.

HU, C.; JIA, W. Diabetes in China: Epidemiology and genetic risk factors and their clinical utility in personalized medication. **Diabetes**, v. 67, n. 1, p. 3-11, 2018. DOI: 10.2337/dbi17-0013.

HU, F. B. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 6, p. 1249-1257, 2011.

HUANG, S.; CZECH, M.P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metabolism Review**, v. 5, n. 1, p. 237-252, 2007. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.03.006.

HUSSAIN, T.; TAN, B.; YIN, Y.; BLACHIER, F.; TOSSOU, M.C.; RAHU, N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 3, p. 1-9, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7432797>.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION – IDF. IDF Diabetes Atlas 2014. **Diabetes Atlas**. Sixth Edition. 2p., 2014.

INZUCCHI, S. E.; BERGENSTAL, R. M.; BUSE, J. B.; DIAMANT, M.; FERRANNINI, E.; NAUCK, M.; PERTERS, A. L.; TSAPAS, A.; WENDER, R.; MATTHEWS, D. R. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient centered approach. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. 140-149, 2015.

JANG, M.H.; KANG, N.H.; MUKHERJEE, S.; YUN, J.W. Theobromine, a methylxanthine in cocoa bean, stimulates thermogenesis by white fat browning and activating brown adipocytes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 6, p. 617-626, 2018. DOI 10.1007/s12257-018-0434-y.

JARAMILLO FLORES, M.E. Cocoa flavanols: Natural agents with attenuating effects on metabolic syndrome risk factors. **Nutrients**, v. 11, n. 751, p. 1-32, 2019. DOI: 10.3390/nu11040751.

JIMÉNEZ, R.; DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F. Epicatechin: Endothelial function and blood pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2012, n. 60, p. 8823-8830, 2012. DOI: dx.doi.org/10.1021/jf205370q.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanism linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 4, p. 840-846, 2006.

KATZ, D.L.; DOUGHTY, K.; ALI, A. Cocoa and chocolate in human health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 10, p. 2779-2811, 2011. DOI: 10.1089/ars.2010.3697.

KAWANO, K.; HIRASHIMA, T.; MORI, S.; SAITOH, Y.; KUROSUMI, M.; NATORI, T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Osaka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. **Diabetes**, v. 41, n. 11, p. 1422-1428, 1992.

KELLEY, D.E.; HE, J.; MENSHIKOVA, E.V.; RITOV, V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2944-2950, 2002. DOI:10.2337/diabetes.51.10.2944.

KIM, M. K.; REAVEN, G. M.; KIM, S. H. Dissecting the relationship between obesity and hyperinsulinemia: role of insulin secretion and insulin clearance. **Obesity**, v. 25, n. 2, p. 378-383, 2017.

KLEINERT, M.; CLEMMENSEN, C.; HOFMMAN, S. M.; MOORE, M. C.; RENNER, S.; WOODS, S. C.; HUYPENS, P.; BECKERS, J.; ANGELIS, M. H.; SCHURMANN, A.; BAKHTI, M.; KLINGENSPOR, M.; HEIMAN, M.; CHERRINGTON, A. D.; RISTOW, M.; LICKET, H.; WOLF, E.; HAVEL, P. J.; MULLER, T. D.; TSCHOP, M. H. Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nature Review Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 140-162, 2018.

KORD-VARKANEH, H.; GHAEDI, E.; NAZARY-VANANI, A.; MOHAMMADI, H.; SHAB-BIDAR, S. Does cocoa/dark chocolate supplementation have favorable effects on body weight, body mass index, and waist circumference? A systematic review, meta-analysis and dose-response of randomized clinical trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 2346-2362, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1451820>.

KUIPERS, H.; VERSTAPPEN, F.T.; KEIZER, H.A.; GEURTEN, P.; VAN KRANENBURG, G. Variability of aerobic performance in the laboratory and its physiologic correlates. **International Journal of Sports Medicine**, v. 6, n. 4, p. 197-201, 1985. DOI: 10.1055/s-2008-1025839.

KUMAR, A.S.; MAYA, A.G.; SHASTRY, B.A.; VAISHALI, K.; RAVISHANKAR, N.; HAZARI, A.; GUNDMI, S.; JADHAV, R. Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 62, n. 2019, p. 98-103, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2018.11.001>.

KWON, M.; EOM, J.; KIM, D.; KIM, J.; HEREDIA, J.; KANG, S.W.; SONG, Y. Skeletal muscle tissue TRIB3 links obesity with insulin resistance by autophagic degradation of Akt2.

Cell Physiology and Biochemistry, v. 2018, n. 48, p. 1543-1555, 2018. DOI: 10.1159/000492264.

KWON, O.; KIM, K.W.; KIM, M.S. Leptin signaling pathways in hypothalamic neurons. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 2016, n. 73, p. 1457-1457, 2016. DOI: 10.1007/s00018-016-2133-1.

LIMA, A.F.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R.; CINTRA, D.E.; FREDERICO, M.J.; PINHO, R.A.; VELLOSO, L.A.; De SOUZA, C.T. Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. **Journal of Cellular Physiology**, v. 22, n. 1, p. 92-97, 2009. DOI: 10.1002/jcp.21833.

LIN, X.; ZHANG, I.; LIA, A.; MANSON, J. E.; SESSIO, H. D.; WANG, L.; LIU, S. Cocoa flavanol intake and biomarkers for cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 11, p. 2325-2333, 2016. DOI: 10.3945/jn.116.237644.

LIN, Y.; SUN, Z. Current views on type 2 diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 2010, n. 204, p. 1-11, 2010.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v. 25, n. 3, p. 402-408, 2001. DOI:10.1006/meth.2001.1262.

LOWELL, B.B.; SHULMAN, G.I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, v. 307, n. 21, p. 384-387, 2005. DOI: 10.1126/science.1104343.

LOZANO, I.; WERF, R. V.; BIETIGER, W.; SEYFRITZ, E.; PERONET, C.; PINGET, M.; JEANDIDIER, N.; MAILLARD, E.; MARCHIONI, E.; SIGRIST, S.; DAL, S. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. **Nutrition and Metabolism**, v. 13, n. 15, p. 1-13, 2016.

LUDOVICI, V.; BARTHELMES, J.; NAGELE, M.P.; ENSELEIT, F.; FERRI, C.; FLAMMER, A.J.; RUSCHITZKA, F.; SUDANO, I. Cocoa, blood pressure, and vascular function. **Frontiers in Nutrition**, v. 4, n. 36, p. 1-12, 2017. DOI: 10.3389/fnut.2017.00036.

LUNDSGAARD, A.M.; FRITZEN, A.M.; KIENS, B. Molecular regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle during aerobic exercise. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 18-30, 2018.

MACREADY, A. L.; KENNEDY, O. B.; ELLIS, J. A.; WILLIAMS, C. M.; SPENCER, J. P.; BUTLER, L. T. Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. **Genes Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 227-242, 2009.

MAHMOUD, A. M.; HOZAYEN, W. G.; SOLIMAN, H. A.; MOSTAFA, S. R. Enteromorpha flexuosa Improves Insulin Sensitivity and Metabolic Control in Fructose-Induced Diabetic Rats. **Journal of Endocrinology and Diabetes Obesity**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2015.

MARINHO, R.; MEKARY, R.A.; MUNOZ, V.R.; GOMES, J.R.; PAULI, J.R.; MOURA, L.P. Regulation of hepatic TRB3/Akt interaction induced by physical exercise and its effect on the hepatic glucose production in an insulin resistance state. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, n. 67, p. 1-7, 2015. DOI 10.1186/s13098-015-0064-x.

MARINHO, R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; DA SILVA, A. S. R.; BERTOLI, F. C.; COLANTONIO, E.; D'ALMEIDA, V.; PAULI, J. R. Endurance exercise training increase APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 3, p. 2917-2926, 2012.

MARTIN, M.A.; GOYA, L.; RAMOS, S. Antidiabetic actions of cocoa flavanols. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 60, n. 8, p. 1756-1769, 2016. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500961>.

MASKARINEC, G.; JACOBS, S.; BOUSHEY, C.J.; SETIAWAN, V.W.; KOLONEL, L.N.; HAIMAN, C.A.; MARCHAND, L.L. Intake of cocoa products and risk of type-2 diabetes: the multiethnic cohort. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 5, p. 671-678, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0188-9>.

MASSARO, M.; SCODITTI, E.; CARLUCCIO, M.A.; KALTSATOU, A.; CICHELLA, A. Effect of cocoa products and its polyphenolic constituents on exercise performance and exercise-induced muscle damage and inflammation: A review of clinical trials. **Nutrients**, v. 11, n. 4, p. 1-15, 2019. DOI: 10.3390/nu11071471.

MASSOT, E.T.; VAN HAARD, P.M.; REHFELD, J.F.; POSTHUMA, E.F.; VAN DER VEER, E.; SCHWEITZER, D.H. Appetite suppression through smelling of dark chocolate correlates with changes in ghrelin in young women. **Regulatory Peptides**, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2010. DOI: 10.1016/j.regpep.2010.01.005.

McGEE, S.L.; DENDEREN, B.J.W.; HOWLETT, K.F.; MOLLICA, J.; SCHERTZER, J. D.; KEMP, B.E.; HARGREAVES, M. AMP-Activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating Histone Deacetylase 5. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 860-867, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2337/db07-0843>.

McGEE, S.L.; HARGREAVES, M. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanism. **Clinical Experimental Pharmacology**, v. 1, n. 33, p. 395-399, 2006. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2006.04362.x.

McGINLEY, S. K.; ARMSTRONG, M. J.; BOULE, N. G.; SIGAL, R. J. Effects of exercise training using resistance bands on glycaemic control and strength in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Acta Diabetologica**, v. 5, n. 52, p. 221-230, 2015.

MEEK, T.H.; MORTON, G. The role of leptin in diabetes: metabolic effects. **Diabetologia**, v. 59, n. 5, p. 928-932, 2016. DOI 10.1007/s00125-016-3898-3.

MEIJER, R. I.; De BOER, M. P.; GROEN, M. R.; ERINGA, E. C.; RATTIGAN, S.; BARETT, E. J.; SMULDERS, Y. M.; SERNE, E. H. Insulin-induced microvascular recruitment in skin and muscle are related and both are associated with whole-body glucose uptake. **Microcirculation**, v. 19, n. 3, p. 494-500, 2012.

MINOKOSHI, Y.; TODA, C.; OKAMOTO, S. Regulatory role of leptin in glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 3, p. 562-568, 2012. DOI: 10.4103/2230-8210.105573.

NICHOLSON, T.; CHURCH, C.; BAKER, D.J.; JONES, S.W. The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity. **Journal of Inflammation**, v. 15, n. 9, p. 1-11, 2018. DOI: 10.1186/s12950-018-0185-8.

NING REN.; KIM, E.; LI, B.; PAN, H.; TONG, T.; YANG, C.S.; TU, Y. Flavonoids alleviating insulin resistance through inhibition of inflammatory signaling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 5361-5373, 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b05348.

NIU, Y.; WANG, T.; LIU, S.; YUAN, H.; LI, H.; FU, L. Exercise-induced GLUT4 transcription via inactivation of HDAC4/5 in mouse skeletal muscle in a AMPK α 2-dependent manner. **Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2017, p. 2372-2381, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.001>.

NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169-181, 2011.

NOMURA, K.; YAMANOUCHI, T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 203-208, 2012.

NOURBAKHSI, M.; SHARIFI, R.; GHORBANHOSSEMI, S.S.; JAVAD, A.; AHMADPOUR, F.; AZAR, M.R.; LARIJANI, B. Evaluation of plasma TRB3 and sestrin 2 levels in obese and normal-weight children. **Childhood Obesity**, v. 13, n. 5, p. 1-6, 2017. DOI: 10.1089/chi.2017.0082.

OLOKOBA, A. B.; OBATERU, O. A.; OLOKOBA, L. B. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. **Oman Medical Journal**, v. 27, n. 3, p. 269-273, 2012.

OSTROWSKI, K.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B.K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans – effects of intensity of exercise. **European Journal Applied Physiology**, v. 83, n. 6, p. 512-515, 2000. <https://doi.org/10.1007/s004210000312>.

PASSOS, R. L. F. **Relação entre quantidade de exercício físico realizado e conteúdo calórico da dieta**. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. Tese de doutorado. Belo Horizonte, 82p. 2015.

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; CARVALHO-FILHO, M. A.; MORAES, J. C.; DE SOUZA, C.T.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate1 and protein kinaseB/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **Journal of Physiology**, v. 586, n. 4, p. 659–671, 2008.

PEDERSEN, B.K. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 1, p. 600-611, 2017. DOI: 10.1111/eci.12781.

PEREIRA, R. M.; BOTEZELLI, J. D.; RODRIGUES, K. C. C.; MEKARY, R. A.; CINTRA, D. E.; PAULI, J. R. Fructose consumption in the development of obesity and the effects of different protocols of physical exercise on the hepatic metabolism. **Nutrients**, v. 9, n. 405, p. 1-21, 2017.

PETERSEN, M.C.; VATNER, D.F.; SHULMAN, G.I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. **Nature Review Endocrinology**, v. 13, n. 10, p. 572-587, 2017. DOI:10.1038/nrendo.2017.80.

PRAKASH, M.; BASAVARAJ, B.V.; MURTHY, K.N.C. Biological functions of Epicatechin: Plant cell to human cell health. **Journal of Functional Foods**, v. 52, n. 2019, p. 14-24, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.021>.

PRÍMOLA-GOMES, T. N.; CAMPOS, L. A.; LAUTON-SANTOS, S. BALTHAZAR, C. H.; GUATIMOSIM, S. CAPETTINI, L. S.; LEMOS, V. S.; COIMBRA, C. C.; SOARES, D. D.; CARNEIRO-JUNIOR, M. A.; QUINTAO-JUNIOR, J. F.; SOUZA, M. O.; CRUZ, J. S.; NATALI, A. J. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. **Journal Applied Physiology**, v. 107, n. 2, p. 593-598, 2009. DOI: 10.1152/jappphysiol.91218.2008.

QU, Q.; ZENG, F.; LIU, X.; WANG, Q.J.; DENG, F. Fatty acid oxidation and carnitina palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. **Cell and Disease**, v. 7, n. e2226, p. 1-9, 2016. DOI:10.1038/cddis.2016.132.

RABADÁN-CHAVES, G.; QUEVEDO-CORONA, L.; GARCIA, A.M.; REYES-MALDONADO, E.; JARAMILLO-FLORES, M.E. Cocoa powder, cocoa extract and Epicatechin attenuate hypercaloric diet-induced obesity through enhanced β -oxidation and energy expenditure in white adipose tissue. **Journal of Functional Foods**, v. 20, n. 2016, p. 54-67, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.016>.

RAMOS, S.; MARTIN, M.A.; GOYA, L. Effects of cocoa antioxidants in type 2 diabetes mellitus. **Antioxidants**, v. 6, n. 84, p. 1-16, 2017. doi:10.3390/antiox6040084.

RAVEENDRAN, A.K.; CHACKO, E.C.; PAPPACHAN, J.M. Non-pharmacological treatment options in the management of diabetes mellitus. **European Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 31-39, 2018. DOI: 10.17925/EE.2018.14.2.31.

REED, M. J.; MESZAROS, K.; ENTES, L. J.; CLAYPOOL, M. D.; PINKET, J. G.; GADBOIS, T. M.; REAVEN, G. M. A new model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism**, v. 49, n. 11, p. 1390-1394, 2000.

REGY, J.; PADMAJA, G. Comparative Studies on the Production of Glucose and High Fructose Syrup from Tuber Starches. **International Research Journal of Biological Science**, v.1, n. 2, p. 68-75, 2013.

REN, X.; CHEN, N.; CHEN, Y.; LIU, W.; HU, Y. TRB3 stimulates SIRT1 degradation and induces insulin resistance by lipotoxicity via COP1. **Experimental Cell Research**, v. 382, n. 1, 111428, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.009>.

ROCKL, K. S.; WITCZAK, C. A.; GOODYEAR, L. J. Signaling mechanisms in skeletal muscle: Acute responses and chronic adaptations to exercise. **IUBMB Life**, v. 60, n. 3, p. 145-153, 2008.

RODEN, M.; PETERSEN, K.; SHULMAN, G. Insulin resistance in type 2 diabetes. **Textbook of Diabetes**, v. 5, p. 174-186, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118924853.ch13>.

ROHLING, M.; HERDER, C.; STEMPER, T.; MUSSING, K. Influence of acute and chronic exercise on glucose uptake. **Journal of Diabetes Research**, v.2016, n. 4, p. 1-34, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2868652>.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; PRADA, P. O.; DE SOUZA, C. T.; PICARDI, P. K.; FARIA, M. C.; CINTRA, D. E.; FERNANDES, M. F.; FLORES, M. B.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J.; CARVALHEIRA, J. B. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **Journal of Physiology**, v. 577, n. 8, p. 997–1007, 2006.

RUIJTERS, E. J.; WESELER, A. R.; KICKEN, C.; HAENEN, G. R.; BAST, A. The flavanol (-)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effects. **European Journal Pharmacology**, v. 715, n. 3, p. 147-153, 2013.

SANCHEZ, D.; MOULAY, L.; MUGUEZZA, B.; QUINHONES, M. Effect of a soluble cocoa fiber-enriched diet in Zucker fatty rats. **Journal of Medicine and Food**, v. 13, n. 15, p. 621-628, 2010.

SHAY, J.; ELBAZ, H. A.; LEE, I.; ZIELSKE, S. P.; MALEK, M. H.; HUTTEMANN, M. Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes and neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, n. 7, p. 1-13, 2015. DOI: 10.1155/2015/181260.

SHENOUDA, M. S.; WIDLANSKY, M. E.; CHEN, K.; XU, G.; HOLBROOK, M.; TABIT, C. E.; HAMBURG, N. M.; CAIANO, T. L.; KLUGE, M. A.; LEVIT, A.; KIM, B.; HARTMAN, M. L.; JOSEPH, L.; SHIRIHAI, O. S.; VITA, J. A. Altered Mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Circulation**, v. 1, n. 124, p. 444-453, 2011.

SHIOTA, M.; PRINTZ, P. L. Diabetes in Zucker diabetic fatty rat. **Methods Molecular Biology**, v. 933, n. 7, p. 103-123, 2012.

SIVITZ, W.I.; YOREK, M.A. Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanism to functional significance and therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 12, n. 4, p. 537-577, 2010. DOI: 10.1089/ars.2009.2531.

SKOVSO, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 5, n. 4, p. 349-358, 2014.

SKYLER, J.S.; BAKRIS, G.L.; BONIFACIO, E.; DARSOW, T.; ECKEL, R.H.; GROOP, L.; GROOP, P.H.; HANDELSMAN, Y.; INSEL, R.A.; MATHIEU, C.; McELVAINE, A.T.; PALMER, J.P.; PUGLIESE, A.; SCHATZ, D.A.; SONSENKO, J.M.; WILDING, J.P.H.; RATNER, R. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history and prognosis. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 241-255, 2017. DOI: 10.2337/db16-0806.

SOFTIC, S.; MEYER, J.G.; WANG, G.X.; GUPTA, M.J.; BATISTA, T.M.; LAURITZEN, H.P.M.M.; FUJISAKA, S.; SERRA, D.; HERRERO, L.; WILLOUGHBY, J.; FITZGERALD, K.; IKAYEVA, O.; CHRISTOPHER, B.N.; GIBSON, B.W.; SCHILLING, B.; COHEN, D.E.; KAHN, R. Dietary sugars alter hepatic fatty oxidation via transcriptional and post-translational modifications of mitochondrial proteins. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 30, p. 735-753, 2019. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.09.003.

SOKOLOV, A. N.; PAVLOVA, M. A.; KLOSTERHALFEN, S.; ENCK, P. Chocolate and the brain: neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. **Neuroscience Biobehavior Review**, v. 37, n. 2, p. 2445-2453, 2013.

SOMERVILLE, V.; BRINGANS, C.; BRAAKHUIS, A. Polyphenols and performance: a systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 47, n. 8, p. 1589-1599, 2017. DOI: 10.1007/s40279-017-0675-5.

SOMERVILLE, V.; BRINGANS, C.; BRAAKHULS, A. Polyphenols and Performance: A systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 1, n. 3, p. 15-21, 2017

SPENCER, J. P. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. **British Journal Nutrition**, v. 104, n. 3, p. 40-47, 2010.

SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, L.; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. Combination of high-fat diet-fed and low dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screenin. **Pharmacological Res.**, v. 2005, n. 52, p. 313-320, 2005.

STANDFORD, K.L.; GOODYEAR, L.J. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. **Advances in Physiology Education**, v. 38, n. 4, p. 308-314, 2014. DOI: 10.1152/advan.00080.2014.

STANHOPE, K. L. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. **Critical Review Clinical and Laboratory Science**, v. 53, n. 2, p. 52-67, 2016.

STEENSBERG, A.; FISCHER, C.P.; KELLER, C.; MOLLER, K.; PEDERSEN, B.K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **American Journal of the Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 2, p. 433-437, 2003. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00074.2003>.

STELLINGWERFF, T.; GODIN, J. P.; CHOU, C. J.; GRATHWOHL, D.; ROSS, A. B.; COOPER, K. A. The effect of acute dark chocolate consumption on carbohydrate metabolism and performance during rest and exercise. **Apply Physiology and Nutrition Metabolism**, v. 39, n. 11, p. 173-182, 2014.

STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 10, p. 770-784, 2016.

STRAT, K.; DAVY, B.M.; HULVER, M.W.; DAVY, K.P.; NEILSON, A.P. Cocoa increases postprandial GLP-1 response in adults with impaired glucose tolerance. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1, p. 428-5-428-5, 2016.

STRAT, K.M.; ROWLEY IV, T.J.; SMITHSON, A. T.; TESSEM, J.S.; HULVER, M.W.; LIU, D.; DAVY, K.P.; NEILSON, A.P. Mechanism by which cocoa flavanols improve metabolic syndrome and related disorders. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 35, n. 2016, p. 1-21, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.12.008>.

STRATTON, I. M.; ALDER, A. I.; NEIL, H. A. W.; MATTHEWS, D. R.; MANLEY, S. E.; TURNER, R. C.; HOLMAN, R. R. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **British Medical Journal**, v. 321, n. 12, p. 405-412, 2000.

SUEN, J.; THOMAS, J.; KRANZ, A.; VUN, S.; MILLER, M. Effect of flavonoids on oxidative stress and inflammation in adults at risk of cardiovascular disease: a systematic review. **Health Care**, v. 4, n. 3, p. 1-12, 2016.

TABIT, C. E.; CHUNG, W. B.; HAMBURG, N. M.; VITA, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. **Review Endocrinology Metabolic Disorders**, v. 1, n. 11, p. 61-74, 2010.

TAUB, P. R.; RAMIREZ-SANCHEZ, I.; PATEL, M.; HIGGINBOTHAM, M.; MORENO-ULLOA, A.; ROMÁN-PINTOS, L. M.; PHILLIPS, P.; PERKINS, G.; CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. Beneficial effects of dark chocolate on exercise capacity in sedentary subjects: underlying mechanisms. A double blind, randomized, placebo controlled trial. **Food and Function**, v. 14, n. 9, p. 3686-3693, 2016.

TOOP, C. R.; GENTILI, S. Fructose beverage consumption induced a metabolic syndrome phenotype in the rat: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 8, n. 577, p. 1-15, 2015.

UMPIERRE, D.; RIBEIRO, P. A. B.; SCHAAN, B. D.; RIBEIRO, J. P. Volume of supervised exercise training impacts glycaemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review with meta-regression analysis. **Diabetologia**, v. 6, n. 56, p. 242-251, 2013. DOI: 10.1007/s00125-012-2774-z.

VARGAS, E.; PODDER, V.; SEPULVEDA, M.A.C. Physiology, glucose transporter type 4 (GLUT4). **StatPearls Publishing**, 2020. PMID: 30726007.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition and Metabolism**, v. 12, n. 60, p. 1-20, 2015. DOI 10.1186/s12986-015-0057-7.

VIOLLET, B. The energy sensor AMPK: Adaptations to exercise, nutritional and hormonal signals. In: *Hormones, Metabolism and the benefits of exercise*. **Research and Perspectives in Endocrine Interactions**, p. 13-24, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72790-5>.

VLACHOPOULOS, C.; AZNAOURIDIS, K.; ALEXOPOULOS, N.; ECONOMOU, E.; ANDREADOU, I.; STEFANADIS, C. Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. 2, p. 785-791, 2005.

WANG, X.; BAO, W.; LIU, J.; OUYANG, Y. Y.; WANG, D.; RONG, S.; XIAO, X.; SHANG, Z. L.; ZHANG, Y.; YAO, P.; LIU, L. G. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 36, n. 4, p. 166-175, 2013.

WATANABE, N.; INAGAWA, K.; SHIBATTA, M.; OSAKABE, N. Flavan-3-ol fraction from cocoa powder promotes mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 64, p. 1-8, 2014. DOI: 10.1186/1476-511X-13-64.

WENSVEEN, F. M.; JELENIC, V.; VALENTIC, S.; WENSVEEN, T. T.; THEURICH, S.; GLASNER, A.; MENDRILA, D.; STIMAC, D.; WUNDERLICH, T.; BRUNING, J. C.; POLIC, B. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 376-387, 2015.

WEST, S. G.; McINTYRE, M. D.; PIOTROWSKI, M. J.; POUPIN, N.; MILLER, D. L.; PRESTON, A. G.; WAGNER, P.; GROVES, L. F.; SKULAS-RAY, A. C. Effects of dark

chocolate and cocoa consumption on endothelial function and arterial stiffness in overweight adults. **The British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 4, p. 653-661, 2014. DOI: 10.1017/S0007114513002912.

WESTWELL-ROPER, C.Y.; EHSES, J.A.; VERCHERE, C.B. Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 β production and β -cell dysfunction. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1698-1711, 2014. DOI: 10.2337/db13-0863.

WHITEMAN, E.L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M.J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 10. 2002.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. Flavonoids, cognition and dementia: actions, mechanism and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 35-45, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diabetes**, 2019. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1. Consultado 27/04/2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on diabetes**, 2016. Disponível em <http://www.who.int/diabetes/en/>

WRIGHT, D.C.. Mechanism of calcium-induced mitochondrial biogenesis and GLUT4 synthesis. **Apply Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 840-845, 2017. DOI: 10.1139/H07-062.

YAMASHITA, Y.; OKABE, M.; NATSUME, M.; ASHIDA, H. Prevention mechanism of glucose intolerance and obesity by cacao liquor procyanidin extract in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 527, n. 1, p. 95-104, 2012.

YARIBEYGI, H.; ATKIN, S.L.; SAHEBKAR, A. Mitochondrial dysfunction in diabetes and the regulatory roles of antidiabetic agents on the mitochondrial function. **Journal of Cellular Physiology**, v. 2019, n. 234, p. 8402-8410, 2019. DOI: 10.1002/jcp.27754.

YARIBEYGI, H.; ATKIN, S.L.; SIMENTAL-MENDÍA, L.E.; SAHEBKAR, A. Molecular mechanism by which aerobic exercise induces insulin sensitivity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 2019, n. 234, p. 12385-12392, 2019. DOI: 10.1002/jcp.28066.

YATES, T.; KHUNTI, K.; BULL, F.; GORELY, T.; DAVIES, M. J. The role of physical activity in management of impaired glucose tolerance: a systematic review. **Diabetologia**, v. 50, n. 6, p. 1116-1126, 2007. DOI: 10.1007/s00125-007-0638-8.

YI, X.; CAO, S.; CHANG, B.; ZHAO, D.; GAO, H.; WAN, Y.; SHI, J.; WEI, W.; GUAN, Y. Effects of acute exercise and chronic exercise on the liver leptin-AMPK-ACC signaling pathway in rats with type 2 diabetes. **Journal of Diabetes Research**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2013.

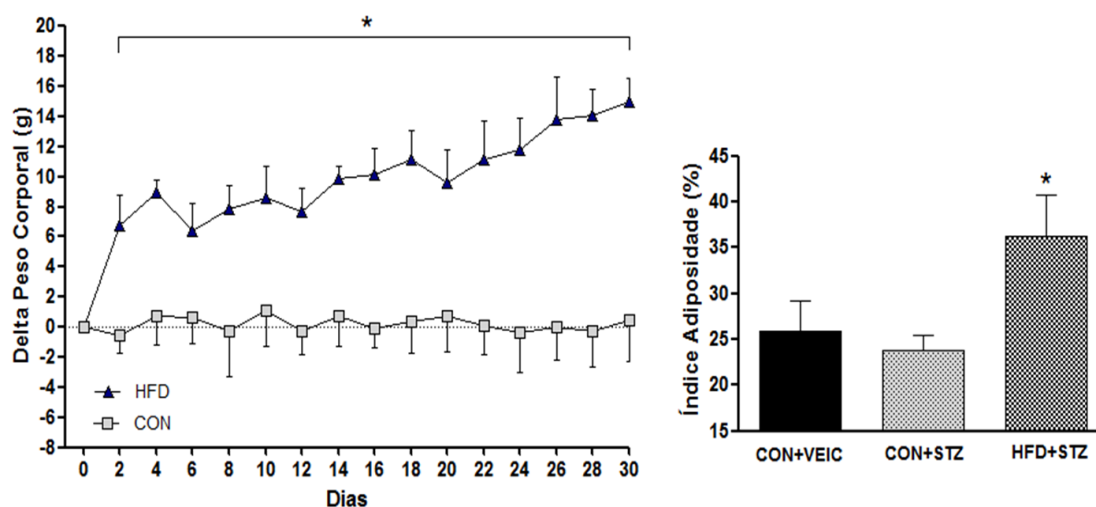
ZAND, H.; MORSHEDZADEH, N.; NAGHASHIAN, F. Signaling pathways linking inflammation to insulin resistance. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**. v. 11, n. 1, p. 307-309, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.03.006>.

ZHANG, C.S.; LI, M.; MA, T.; ZONG, Y.; CUI, J.; FENG, J.W.; WU, Y.Q.; LIN, S.Y.; LIN, S.C. Metformin activates AMPK through the lysosomal pathway. **Cell Metabolism**, v. 24, n. 11, p. 521-522, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.003>.

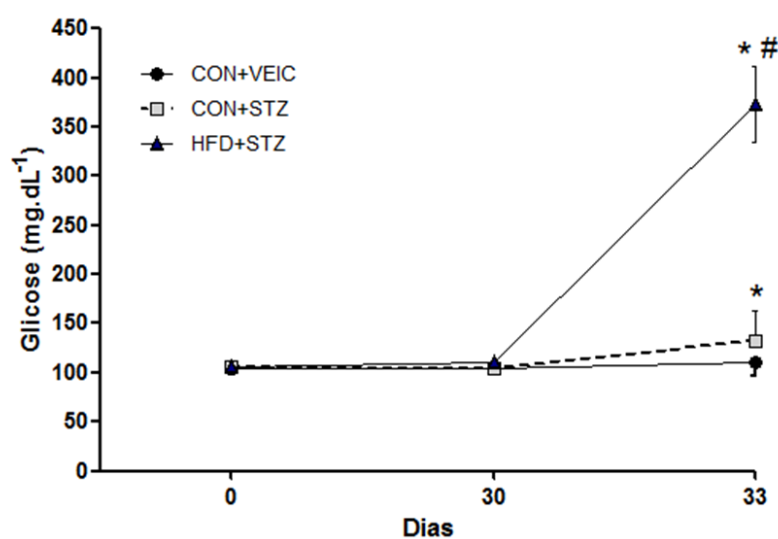
ZHANG, F.; YE, C.; LI, G.; DING, W.; ZHOU, W.; ZHU, H.; CHEN, G.; LUO, T.; GUANG, M.; LIU, Y.; ZHANG, D.; ZHENG, S.; YANG, J.; GU, Y.; XIE, X.; LUO, M. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. **Experimental Physiology**, v. 52, n. 5, p. 401-407, 2003.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 88-98, 2018.

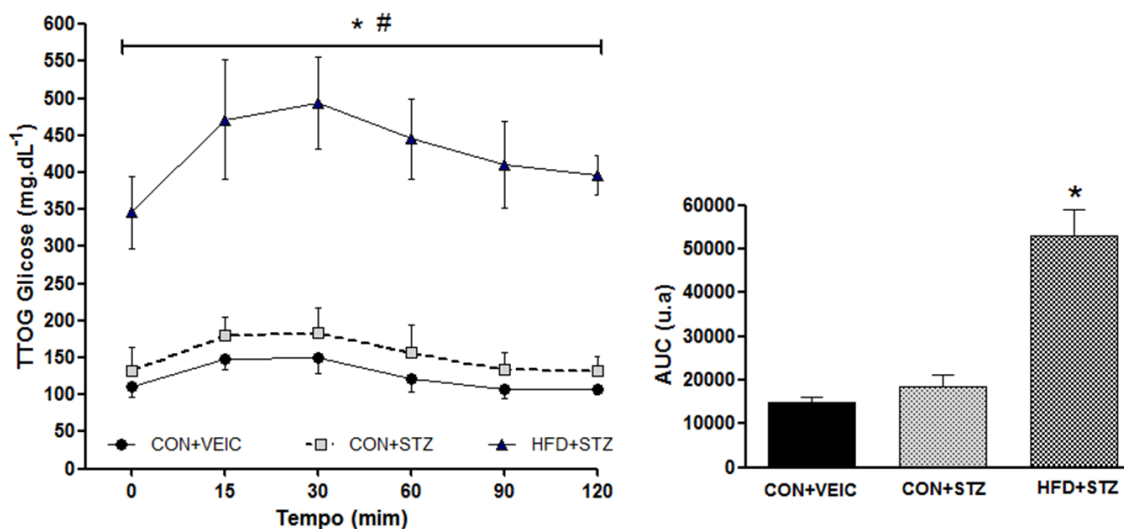
APÊNDICE A – Resultados estudo sobre os efeitos da administração de estreptozotocina ($35\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal) após o consumo de dieta hiperlipídica por 30 dias em ratos Wistar.



* Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$);
Alteração do ganho de massa corporal e índice de adiposidade dos ratos alimentados com dieta padrão (CON) e/ou hiperlipídica (HFD).



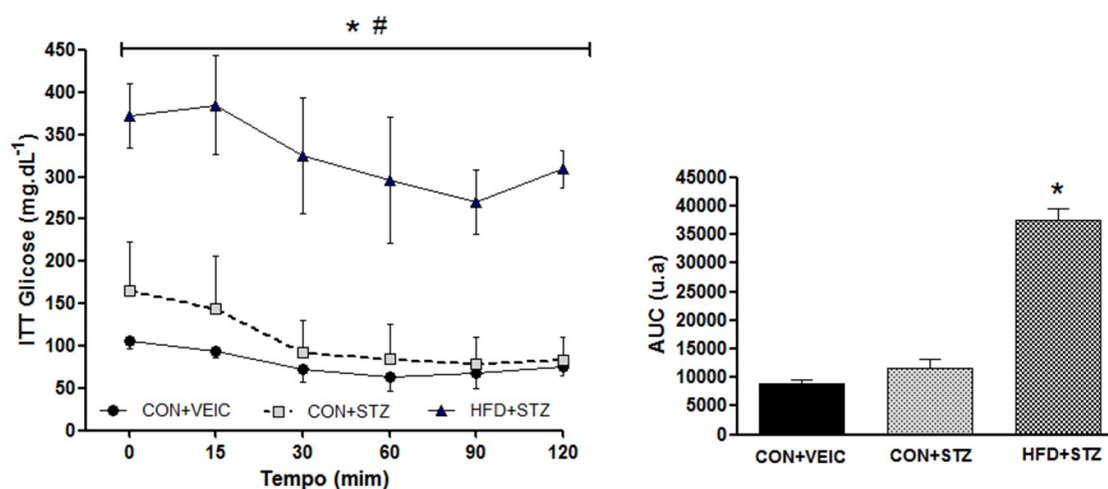
* Diferença significativa em relação ao grupo CON+VEIC ($p < 0,05$);
Diferença significativa em relação ao grupo CON+STZ ($p < 0,05$);
Concentrações de glicose em jejum nos momentos pré (0), após o consumo de dieta padrão (CON) ou hiperlipídica (HFD) por 30 dias (30) e três dias após (33) a administração de estreptozotocina ($35\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal) ou veículo (PLA).



* Diferença significativa em relação ao grupo CON+VEIC ($p < 0,05$);

Diferença significativa em relação ao grupo CON+STZ ($p < 0,05$);

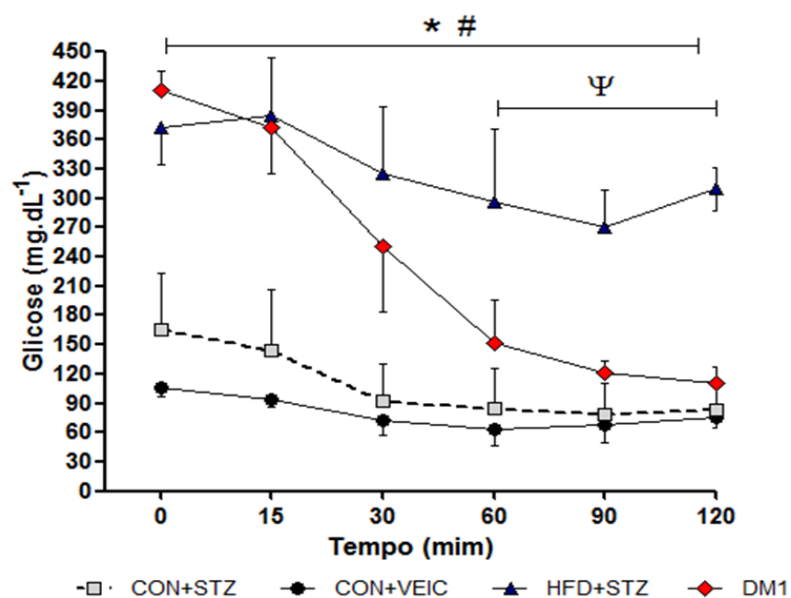
Teste de tolerância oral à glicose e área sob a curva dos grupos CON+VEIC (ratos que receberam a administração de veículo após o consumo de dieta padrão por 30 dias), CON+STZ (ratos que receberam a administração de estreptozotocina 45 mg.kg⁻¹ após o consumo de dieta padrão por 30 dias) e HFD+STZ (ratos que receberam a administração de estreptozotocina 45 mg.kg⁻¹ após o consumo de dieta hiperlipídica por 30 dias).



* Diferença significativa em relação ao grupo CON+VEIC ($p < 0,05$);

Diferença significativa em relação ao grupo CON+STZ ($p < 0,05$);

Teste de resistência à insulina e área sob a curva dos grupos CON+VEIC (ratos que receberam a administração de veículo após o consumo de dieta padrão por 30 dias), CON+STZ (ratos que receberam a administração de estreptozotocina 45 mg.kg⁻¹ após o consumo de dieta padrão por 30 dias) e HFD+STZ (ratos que receberam a administração de estreptozotocina 45 mg.kg⁻¹ após o consumo de dieta hiperlipídica por 30 dias).



* Diferença significativa em relação ao grupo CON+VEIC ($p < 0,05$);

Diferença significativa em relação ao grupo CON+STZ ($p < 0,05$);

Ψ Diferença significativa em relação ao grupo DM1 ($p < 0,05$);

Teste de resistência à insulina e área sob a curva dos grupos CON+VEIC (ratos que receberam a administração de veículo após o consumo de dieta padrão por 30 dias), CON+STZ (ratos que receberam a administração de estreptozotocina após o consumo de dieta padrão por 30 dias), HFD+STZ (ratos que receberam a administração de estreptozotocina após o consumo de dieta hiperlipídica por 30 dias) e DM1 (ratos que receberam a administração de estreptozotocina $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corporal estreptozotocina após o consumo de dieta padrão por 30 dias).

APENDICE B - Padronização do modelo para indução de resistência à insulina

Com o objetivo de compreender os mecanismos fisiológicos decorrentes da hiperglicemia e pelos quais diferentes intervenções podem contribuir para atenuar as alterações decorrentes do DM2, diversos estudos experimentais utilizando ratos e camundongos têm sido propostos na literatura.

Neste sentido, ratos espontaneamente diabéticos obtidos por meio de cepas geneticamente resistentes à insulina (KAWANO *et al.*, 1992; SHIOTA; PRINTZ, 2012) e ratos diabéticos não espontâneos, induzidos experimentalmente por meio da utilização de toxinas, incluindo a estreptozotocina (STZ) (REED, *et al.*, 2000; SRINIVASAN *et al.*, 2005; GHORBANZADEH *et al.*, 2016), e/ou administração crônica de dietas hipercalóricas (MAHMOUD *et al.*, 2015; LOZANO *et al.*, 2016) tem sido considerados os principais modelos animais para investigar DM2.

A administração de STZ tem sido comumente utilizada para induzir a falência das células beta pancreáticas e, conseqüentemente, a DM1 em roedores (DEEDS *et al.*, 2013; HOWARTH *et al.*, 2017). Entretanto, em baixas doses, a falência parcial das células beta pode ocasionar hiperglicemia e DM2 por meio da perda do mecanismo compensatório (hiperinsulinemia) de secreção de insulina (REED *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2003). Neste sentido, embora não haja um consenso na literatura, diversos estudos investigaram os efeitos de diferentes doses de STZ combinadas ou não com dietas hipercalóricas para induzir DM2 em ratos (REED *et al.*, 2000; SRINIVASAN *et al.*, 2005; SKOVSO, 2014).

Em estudo preliminar desta tese (MELO *et al.*, dados ainda não publicados) foram verificados os efeitos de única dose de STZ (35 mg kg^{-1} de massa corporal) após o consumo de dieta hiperlipídica por 30 dias. Os resultados obtidos demonstraram que a combinação desta dieta e STZ foram capazes de induzir o ganho de peso dos ratos, promover alterações no teste de tolerância à insulina e tolerância oral à glicose (Apêndice I). Entretanto, os valores glicêmicos (acima de 300 mg dL^{-1}) e a perda significativa da massa corporal durante os trinta dias após a administração de STZ indicaram que para estudos com intervenções crônicas com este modelo, poderá haver a necessidade de insulino terapia e/ou a administração de fármacos hipoglicemiantes para aumentar a sobrevivência dos ratos (MELO *et al.*, dados ainda não publicados).

Neste sentido, uma vez que a falência das células beta pancreáticas ocorrem apenas após um longo período de tempo e que fatores genéticos *per si* podem não ocasionar a resistência à insulina (DEFRONZO *et al.*, 2015), diversos estudos têm investigado os efeitos do consumo de dietas hipercalóricas sobre a resistência à insulina (BOCARSLY *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2017).

A indução da resistência à insulina por meio de dietas hipercalóricas tem sido considerada uma estratégia de grande validade ecológica por maximizar as alterações metabólicas encontradas em seres humanos (BOCARSLY *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2017). Isso se deve ao fato de que o consumo de alimentos ricos em gorduras e/ou açúcares tem aumentado exponencialmente na sociedade moderna, resultando no aumento da prevalência da obesidade e DM2 na população (NOLAN *et al.*, 2013; LOZANO *et al.*, 2016).

Os efeitos deletérios do consumo crônico de dietas hipercalóricas, especificamente dietas ricas em gorduras saturadas, já foram bem descritos na literatura. Estudos recentes demonstraram que ratos alimentados com dieta hiperlipídica (40-60% de lipídios) podem desenvolver obesidade, aumento na produção de citocinas inflamatórias, hipertrigliceridemia, hipertrofia dos adipócitos, esteatose hepática e resistência à insulina (FLANAGAN *et al.*, 2008; BARBOSA-DA-SILA *et al.*, 2014). Além disso, a metabolização em excesso de lipídios pode ocasionar o aumento do estresse oxidativo e da lipotoxicidade, culminando assim na ativação de vias de sinalização relacionada a apoptose celular em diversos tecidos (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

O consumo de dietas ricas em carboidratos, especificamente em frutose, também tem sido utilizado para induzir resistência à insulina em roedores. Estudos recentes demonstraram que a ingestão crônica de bebidas ricas em frutose induz alterações fenotípicas associadas à síndrome metabólica em ratos adultos, incluindo, hipertensão arterial, hipertrigliceridemia, resistência à insulina e esteatose hepática independente das alterações na composição corporal (MAHMOUD *et al.*, 2015; LOZANO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2017).

Devido à alta palatabilidade e ao uso na industrialização como adoçante substituto para a glicose ou sacarose na preparação de sobremesas, condimentos e diversas bebidas, incluindo refrigerantes e sucos industrializados, o consumo de frutose na população mundial aumentou aproximadamente em 30% nos últimos anos contribuindo significativamente para o desenvolvimento do DM2 na população (REGY *et al.*, 2013; TOOP; GENTILI, 2016).

Embora possa ser absorvida por diferentes tecidos, a frutose é metabolizada principalmente no fígado por meio de sua captação mediada por GLUT2 (PEREIRA *et al.*, 2017). No citoplasma, a frutose pode contribuir para a produção de glicose hepática (gliconeogênese) ou ser rapidamente metabolizada por meio da fosforilação pela ação da enzima frutoquinase (TOOP; GENTILI, 2016). Neste sentido, a metabolização em excesso de frutose nos hepatócitos pode ocasionar a ativação de diferentes vias de sinalização as quais culminam no aumento do estresse oxidativo, na síntese de citocinas inflamatórias, lipogênese, apoptose celular, inibição de eNOS e resistência à insulina hepática (MARINHO *et al.*, 2011; LOZANO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2017).

Estudos recentes demonstraram que a ingestão crônica de frutose pode potencializar os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica ocasionando complicações hepáticas e vasculares em ratos adultos (LOZANO *et al.*, 2016), além de ocasionar aumentos significativos na expressão de RNAm e de proteínas marcadoras de estresse no retículo endoplasmático hepático e pancreático contribuindo assim para a resistência à insulina (BALAKUMAR *et al.*, 2016).

Embora dietas hipercalóricas sejam utilizadas para estudos cujo objetivo seja investigar a obesidade e/ou resistência à insulina, o tempo necessário para induzir as alterações metabólicas decorrentes do consumo da dieta hiperlipídica e/ou ingestão de frutose (aproximadamente 12-20 semanas), tem sido considerado o principal fator limitante para utilização deste modelo em roedores para os estudos com intervenções crônicas. Além disso, os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica associados à ingestão de frutose em curto prazo, sobre os parâmetros associados à resistência à insulina, ainda são desconhecidos.

APENDICE C - Short-term combined consumption of high-fat-diet and fructose-rich beverage promotes insulin resistance and modulates inflammatory response and histomorphometry parameters of liver, pancreas and adipose tissue in Wistar rats

MELO, BP¹; ZACARIAS AC¹, OLIVEIRA JCC¹, DE SOUZA CORDEIRO LM², SABINO J³, FERREIRA AVM³, TONOLI C⁴, DOS SANTOS ML⁵, AVELAR GF⁵, MEEUSEN R⁶, HEYMAN E⁶, SOARES DD¹

1 – The Federal University of Minas Gerais, Department of Physical Education, Exercise Physiology Laboratory, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 Campus-Pampulha, Belo Horizonte, Brazil.

2 – Division of Endocrinology and Metabolism. Department of Medicine. University of Rochester Medical Center, 601 Elmwood Ave, Box 693 Rochester, NY 14642, Rochester, New York.

3 – The Federal University of Minas Gerais, Department of Nutrition, Immunometabolism Laboratory, Av. Alfredo Balena 190, Belo Horizonte, Brazil.

4 – Department of Rehabilitation Sciences and Physiotherapy, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiteit Gent, Campus Heymans (UZ Gent), Building B3-De Pintelaan 185, 9000, Ghent, Belgium.

5 - Federal University of Minas Gerais, Departament of Morphology, Cellular Biology Laboratory, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 Campus-Pampulha, Belo Horizonte, Brazil;

6 - Human Physiology Research Group, Faculty of Physical Education and Physical Therapy, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050, Brussels, Belgium. romain.meeusen@vub.be.

7 – Univ. Lille, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d’Opale, EA 7369 - URePSSS - Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société, F-59000 Lille, France.

Corresponding Author:

Prof^a. Phd. Danusa Dias Soares

Federal University of Minas Gerais

Departament of Physical Education

Exercise Physiology Laboratory

Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 Campus-Pampulha, Belo Horizonte, Brazil.

Phone: +55 (31) 3409-2350

E-mail: danusa56@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Consumption of high-fat-diet (HFD) and fructose-rich beverages (FRT) increases significantly in the world population contributing to the development of obesity and type 2 diabetes (DM2). Although the chronic consumption of hypercaloric diets is used to induce insulin resistance in rodents, the combined effects of HFD and FRT over a shorter period have been poorly investigated. **Objective:** We aimed at exploring the effects of the consumption of the HFD combined with FRT for thirty days in promoting metabolic and physiological changes associated with insulin resistance, including, inflammatory and histomorphometric parameters in the liver, pancreas and adipose tissue of Wistar rats. **Methods:** Thirty-two male Wistar rats (250 ± 10 g) were randomly allocated into four groups ($n = 8$) which received standard diet (CON), HFD (48.39% Fat; 30.06% CHO; 21.54% Pro), FRT (solution 30%) or both (HFD+FRT) for thirty days. Insulin sensitivity and glucose tolerance were evaluated by the insulin tolerance test (ITT) and oral glucose tolerance test (OGTT). Serum samples were used for analysis of metabolic parameters and hormone levels. The IL-6, IL-10, IL-1 β , and TNF- α assays were performed in liver, pancreas, gastrocnemius muscle and epididymal adipose tissue by ELISA. Histological and morphometric analyses were analyzed on the liver, pancreas and adipose tissue. **Results:** Consumption combined of HFD and FRT promoted significantly increase ($p < 0.05$) on body weight, index adiposity, in area under curve on ITT ($p < 0.001$) and OGTT ($p < 0.001$) when compared to the CON group. Consumption of FRT alone increased fasting glucose ($p = 0.015$), insulin ($p = 0.035$) and HOMA-index ($p = 0.018$), and these changes were in greater magnitude on when FRT was combined with HFD. Moreover, the rats fed with HFD+FRT demonstrated significantly increase of lipids droplets in liver ($p < 0.001$), increase a 7-fold in adipocyte area and increase in inflammatory cytokines in liver, pancreas, skeletal muscle and adipose tissue. **Conclusion:** Consumption of HFD combined with FRT for thirty days promotes insulin resistance, increase cytokines inflammatory and modulates histomorphometric parameters of the liver, pancreas and adipose tissue, therefore, demonstrating to be a useful, effective and short-term model for studies on insulin resistance in rodents.

Keywords: Animal model, Type 2 diabetes; Glucose; Metabolism; Hepatic complications; Obesity

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a disease characterized by heterogeneous disorders of carbohydrates, lipids and proteins metabolism causing resulting either from a deficiency in insulin secretion (DM type 1) or insulin resistance (DM type 2) (INZUCCHI *et al.*, 2015). Characterized as a chronic multifactorial disease, several factors may contribute to the development and progression of insulin resistance, including genetic factors, overweight and/or obesity, insomnia, as well as economic and psychosocial factors (HU, 2011).

Type 2 diabetes (DM2) has the highest prevalence (90 to 95%) among all cases of diagnosis of the disease, prevailing in the population aged between 30 and 69 years (DESHPANDE *et al.*, 2008; ADA, 2014; IDF, 2014). The sedentary behavior associated with consumption of hypercaloric diet has been considered the principal factors for the increase in obesity and DM2 in the world population (HU, 2011; ZHENG; LEY; HU, 2018). Recently, evidence demonstrated a link between chronic consumption of high-fat diet and fructose-rich beverage with increase of body weight, inflammatory status and insulin resistance (HORST *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2017; CORTE, *et al.*, 2018). The decrease in the sensitivity of target tissues to the metabolic effect of insulin is one of the main characteristics of DM2 presenting a clinical picture of chronic hyperglycemia (ALBERTI; ZIMMET, 1998; ADA, 2014; INZUCCHI *et al.*, 2015).

In order to understand the physiological mechanisms resulting from hyperglycemia and which different interventions may contribute to attenuate the physiological changes due to DM2, several experimental studies using rodents have been proposed. Therefore, models of spontaneously diabetic rats obtained through genetically resistant insulin strains (KAWANO *et al.*, 1992; SHIOTA; PRINTZ, 2012) and models of non-spontaneous diabetic rats, experimentally obtained through the use of toxins, including streptozotocin (REED, *et al.*, 2000; SRINIVASAN *et al.*, 2005; GHORBANZADEH *et al.*, 2016) or through chronic long-lasting administration of hypercaloric diets (MAHMOUD *et al.*, 2015; LOZANO *et al.*, 2016; ZHENG; LEY; HU, 2018) have been the main used models for studying DM2 in rodents.

Insulin resistance induced by chronic consumption of high-fat or carbohydrate-rich diets has been commonly used in several experimental studies with rodents models. Recent studies have shown that rats fed with a high-fat diet (40-60% lipids) for long period (12 weeks) may develop obesity and display increased inflammation status, hypertriglyceridemia, adipocyte hypertrophy, increase of transaminases ratio (glutamic oxaloacetic and pyruvic),

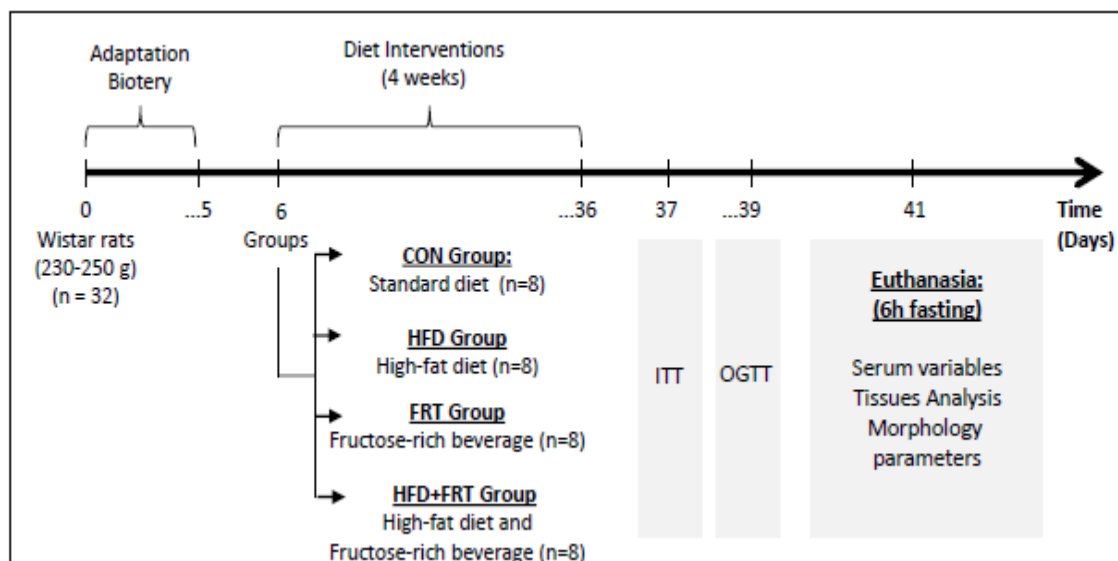
hepatic steatosis, and insulin resistance (FLANAGAN *et al.*, 2008; BARBOSA-DA-SILA *et al.*, 2014). In addition, chronic ingestion of fructose-rich beverages may lead to hepatic and vascular complications in adult rats (LOZANO *et al.*, 2016) and to significantly increase in the expression of mRNA of stress marker proteins (PERK, IRE1 α , CHOP) in the hepatic and pancreatic endoplasmic reticulum, thus contributing to insulin resistance (BALAKUMAR *et al.*, 2016).

Although these diets have been used for studies aiming to investigate obesity and/or insulin resistance, the long time required to induce the desired metabolic and tissue changes (approximately 12-20 weeks), has been considered the main limiting factor for the use of those models in chronic experimental interventions in rodents. In this sense, the effects of a short-term (4 weeks) ingestion of a high-fat-diet associated with a fructose-rich solution intake on metabolic and systemic parameters associated with insulin resistance were not yet investigated. Therefore, we aimed at exploring the effects of the consumption of a high-fat-diet associated to the ingestion of a fructose-rich beverage for thirty days on metabolic and physiological changes associated with insulin resistance, including, inflammatory and histomorphometric parameters in the pancreas, adipose tissue, skeletal muscle and liver of Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Ethics Care

Thirty-two male Wistar rats (body mass 230-250 g, 15 weeks age), provided by the Institute of Biological Sciences of The Federal University of Minas Gerais (UFMG) were used in the experiments. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the UFMG for the Care and Use of Laboratory Animals (protocol 110/2016) and were conducted in accordance with Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation. The rats were housed in collective cages (4 rats in each cage) under controlled temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) and light conditions (lights on from 05:00 am until 07:00 pm).



CON: control group; HFD: High-fat diet; FRT: Fructose-rich beverage; ITT: Insulin tolerance test; OGTT: Oral glucose tolerance test.

Figure 1. Experimental design

Diet Interventions

The rats were randomly separated into four groups: which received, *ad libitum* for a period of thirty days, 1/ standard diet (CON group, macronutrient composition: 8.5% Fat, 38.5% protein; 52.9% carbohydrates; caloric density 263.9 kcal·100g⁻¹; Presence[®]-Brazil), 2/ high-fat-diet (HFD group, macronutrient composition: 48.4% Fat, 21.5% protein; 30.1% carbohydrates; caloric density 457.9 kcal·100g⁻¹), 3/ standard diet and fructose-rich beverage (FRT group, solution 30%; Synth[®]), 4/ or both high-fat-diet diet and fructose-rich beverage (HFD+FRT group) (figure 1). Body mass and energy consumption (Kcal.day⁻¹) were evaluated daily. The energy consumption was obtained by difference of weigh-in food and beverages per day in each cage, divided by 4 (number of rats/cage) and calculated the mean of consumption of each rat over days.

Insulin Tolerance Test (ITT) and Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

Insulin sensitivity and glucose tolerance were evaluated by ITT and OGTT respectively. Both tests were performed after 6 hours of fasting. Blood samples were collected from the tail vein at baseline (0), 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after intraperitoneal (IP)-injection of insulin (0.5 UI·kg⁻¹, Novolin-R, Brazil) or oral gavage of glucose solution (1 g·kg⁻¹, 40% solution, Synth[®]) for ITT tests and OGTT, respectively. Glucose concentration was measured with a glucometer (Accu-Check Performa[®], Roche Diagnostic, France).

Post mortem analyses

The rats were killed by decapitation following 6 hours of fasting. Samples of blood were collected immediately after decapitation, processed (30 min at ambient temperature and centrifugated by 15min at 3500rpm) and stored at -80°C for posterior serum analyzes. The liver, gastrocnemius muscles, epididymal (EAT), retroperitoneal (RAT) and mesenteric adipose tissues (MAT) were dissected, totally removed, weighed and stored at -80°C until further analysis. The epididymal, retroperitoneal and mesenteric adipose tissues were used to calculate the adiposity index:

$$\{[(\text{EAT} + \text{RAT} + \text{MAT}) \div \text{body weight}] \times 100\} \text{ (OLIVEIRA } et al. 2013; \text{ MENEZES-GARCIA } et al. 2014).$$

Interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), interleukin - 1 β (IL-1 β) and Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)

The IL-6, IL-10, IL-1 β , and TNF- α assays were performed in the liver, gastrocnemius muscle and epididymal adipose tissues using DuoSet ELISA kits (DY506, DY522, DY501, and DY510, respectively) according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Serum analyses

Serum samples were used for analysis of glucose (enzymatic kit, Gold Analisa[®], Belo Horizonte, Brazil), insulin (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA; EMD Millipore Corporation[®] – EZRMI-13K, MA, USA), leptin and adiponectin (ELISA kits R&D Systems), total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), glutamic pyruvic and oxaloacetic transaminases (enzymatic colorimetric assays, Lab Test[®] Diagnostic S.A.). Insulin resistance was evaluated using the homeostasis model assessment (HOMA2). HOMA2-IR was calculated for fasting plasma glucose and insulin using the HOMA2 model calculator (<http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator>).

Morphology parameters

Liver, pancreas and epididymal adipose tissue samples were sectioned in different areas of their parenchyma and fixed in 4 % glutaraldehyde dissolved in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.3, for 24 h. The tissues were dehydrated, embedded in resin histology (Leica[®]

HistoResin) and cut into sections (4 μM). Liver, pancreas and adipose tissue sections were then stained with toluidine blue sodium borate and photographed using a digital camera (UC-50 camera) coupled to a microscope (BX-60 Olympus) for histological and morphometric analyses. The quantification of perceptual (%) cell structures (nucleus, cytoplasm, blood vessels) were performed using Image J software (8 rats per group, 15 images per rat and 540 points were quantified in each image). Thirty nuclei of each rat were measured for calculation of the nuclear area by multiplying the radius distances by the value of π ($\pi = 3.14$).

Statistical Analyses

Shapiro-Wilk and the Levene's tests were used to assess the normality and homoscedasticity of data, respectively. The data are expressed as mean values \pm standards deviations except when noted in the figures. One-way analyses of variance (ANOVA) were performed to make comparisons between groups. When the groups were compared over time, repeated-measure two-way ANOVA were used. When significant differences were found, the Tuckey post hoc test was then performed. All statistical analyses were performed using the SigmaPlot software (version 11.0, SYSTAT SOFTWARE, USA), adopting a significance level of $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$).

RESULTS

The combination of the ingestion of high-fat-diet and fructose-rich beverage promoted a significant increase ($p < 0.05$) in body weight and in adiposity index (figure 2). Moreover, the rats fed with HFD+FRT presented lower daily food intake ($\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$) but higher volume of drink intake when compared to the other groups (table 1). The ingestion of fructose-rich beverage alone or combined with high-fat-diet presented higher of daily energy ingested (kilocalories) when compared with CON and HFD (table 1).

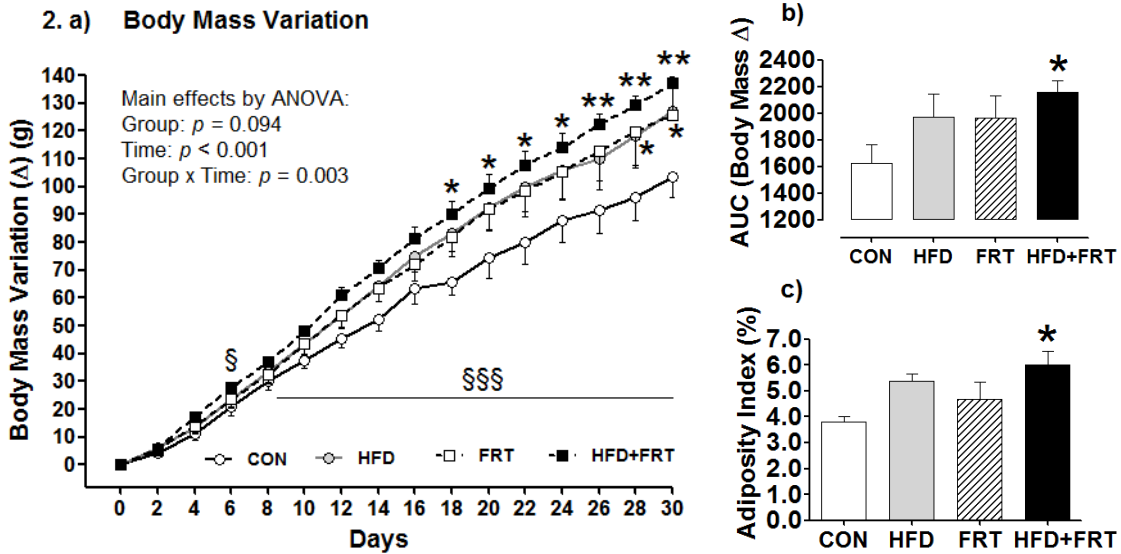
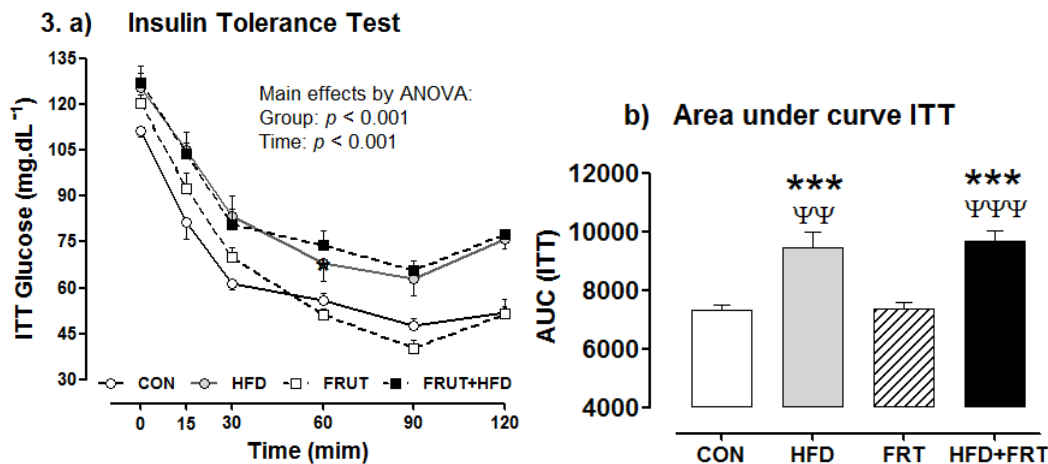


FIGURE 2. Body mass variation (Δ) over the 30 days of intervention (a), area under curve of body mass variation (b) and adiposity index (c) of the CON, HFD, FRT and HFD + FRT groups. Mean (stander error mean); * Significantly different from CON group, § Significantly different from baseline, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; § $p < 0.05$; §§§ $p < 0.001$.

Consumption of high-fat-diet alone or combined with fructose solution promoted significantly increase on the area under the curve ($p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 13.937$) of insulin tolerance test when compared with the CON and FRT groups (figure 3). Although all groups presented higher values in the area under the curve for the oral glucose tolerance test ($p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 15.806$) compared to CON values, only the HFD+FRT group presented higher glucose levels at all times when compared to the CON group (figure 3).



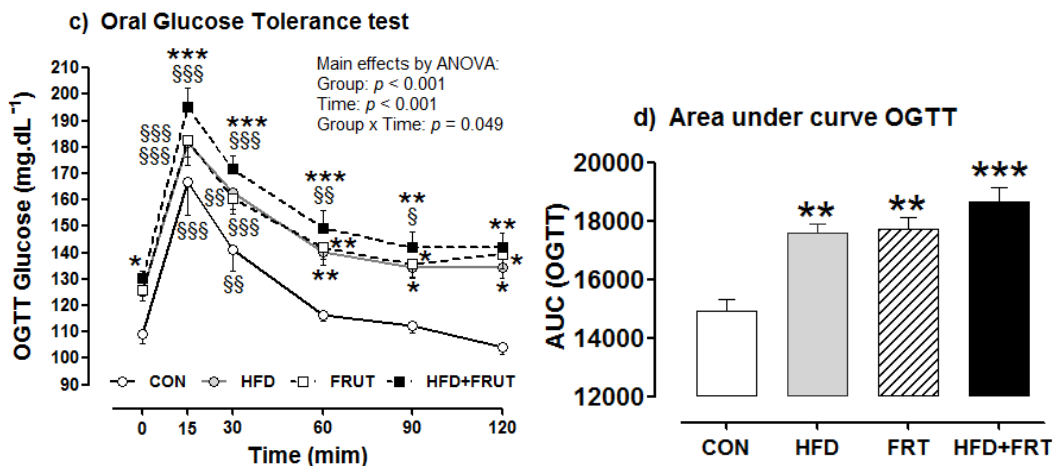


FIGURE 3. Insulin tolerance test (a) and oral glucose tolerance test (b) of the CON, HFD, FRT and HFD+FRT groups. Mean (stander error mean); * Significantly different from CON group; Ψ Significantly different from FRT group; \S Significantly difference from baseline (0); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; \S $p < 0.05$; $\S\S$ $p < 0.01$; $\S\S\S$ $p < 0.001$.

The consumption of fructose solution alone promoted significant changes on glucose homeostasis when compared to the CON group (table 1). However, when fructose solution was combined with high-fat-diet, these modifications were in greater magnitude for fasting glucose, insulin concentration and HOMA-index. Moreover, the combined consumption of high-fat-diet and fructose solution promoted significant reduction in the adiponectin/leptin ratio as shown in table 3.

TABLE 1. Diet consumption, metabolic parameters and hormone levels of the CON, HFD, FRT and HFD+FRT groups.

	CON	HFD	FRT	HFD+FRT	<i>P</i>	<i>F</i> _{0.05;3;28}
Diet Consumption						
Food intake (g.day ⁻¹)	25.8 (2.1)	21.4 (2.1) ^{***}	16.5 (1.9) ^{*** ###}	14.5 (2.0) ^{** ## ψψ}	<0.001	171.08
Drink intake (mL.day ⁻¹)	36.1 (3.5)	31.5 (5.7)	38.1 (3.5)	46.8 (8.6) ^{*** ### ψψψ}	<0.001	21.12
Calories (kcal.day ⁻¹)	81.4 (6.5)	97,3 (9.8) ^{***}	120.7 (10.0) ^{*** ###}	119.3 (14.2) ^{*** ###}	<0.001	90.36
Glucose Homeostasis						
Glucose (mg dL ⁻¹)	108.4 (5.4)	124.5 (14.9) [*]	124.7 (9.5) [*]	139.7 (7.5) ^{*** # ψ}	<0.001	12.90
Insulin (ng dL ⁻¹)	4.1 (0.5)	4.3 (0.9)	6.1 (2.0) [*]	8.1 (1.3) ^{*** ### ψ}	<0.001	15.25
HOMA-index	1.1 (0.1)	1.3 (0.2)	1.9 (0.7) [*]	2.8 (0.6) ^{*** ### ψψ}	<0.001	19.36
Insulin sensitivity (%)	97.9 (12.5)	88.7 (12.7)	70.5 (23.9) ^{**}	51.3 (11.2) ^{*** ###}	<0.001	13.43
Hormone Levels						
Adiponectin (ng mL ⁻¹)	1504.7 (380.1)	972.1 (492.6) [*]	993.7 (174.2) [*]	638.6 (263.9) ^{***}	<0.001	8.39
Leptin (ng mL ⁻¹)	818.5 (684.7)	1745.8 (955.9)	2119.6 (967.5)	2477.5 (923.7)	0.552	0.71
Ratio Adipon. / Leptin	4.8 (3.3)	2.5 (1.3)	2.9 (2.3)	1.8 (0.5) ^{**}	0.008	4,74
Lipids Profile						
Total Cholesterol (mg dL ⁻¹)	85.2 (17.5)	86.7 (18.1)	88.3 (6.2)	89.9 (8.7)	0.95	0.11
HDL cholesterol (mg dL ⁻¹)	14.5 (2.2)	13.5 (3.6)	13.2 (1.5)	12.4 (1.3)	0.37	1.07
LDL cholesterol (mg dL ⁻¹)	46.1 (3.8)	41.7 (5.4)	38.1 (7.2)	36.3 (3.1)	0.10	2.27
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	123.2 (19.5)	157.6 (17.8)	185.1 (49.3) ^{**}	256.1 (36.2) ^{*** ### ψψ}	<0.001	22.88
Transaminases (U L⁻¹)						
Glutamic Oxaloacetic	76.4 (15.3)	74.5 (51.8)	137.9 (66.5) [*]	140.9 (46.7) ^{* #}	0.01	4.58
Glutamic Pyruvic	56.0 (15.3)	36.1 (11.7)	45.0 (15.8)	36.6 (11.7)	0.08	2.39
Ratio (TGO / TGP)	1.46 (0.3)	2.0 (1.0)	2.9 (0.8)	4.2 (2.1) ^{*** ##}	<0.001	7.20

HDL: High-Density-Lipoprotein; LDL: Low-Density-Lipoprotein; * Significantly different from CON group; # Significantly different from HFD group; ψ Significantly different from FRT group; * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001; # *p* < 0.05; ### *p* < 0.01; ### *p* < 0.001; ψ *p* < 0.05; ψ ψ *p* < 0.01; ψ ψ ψ *p* < 0.001;

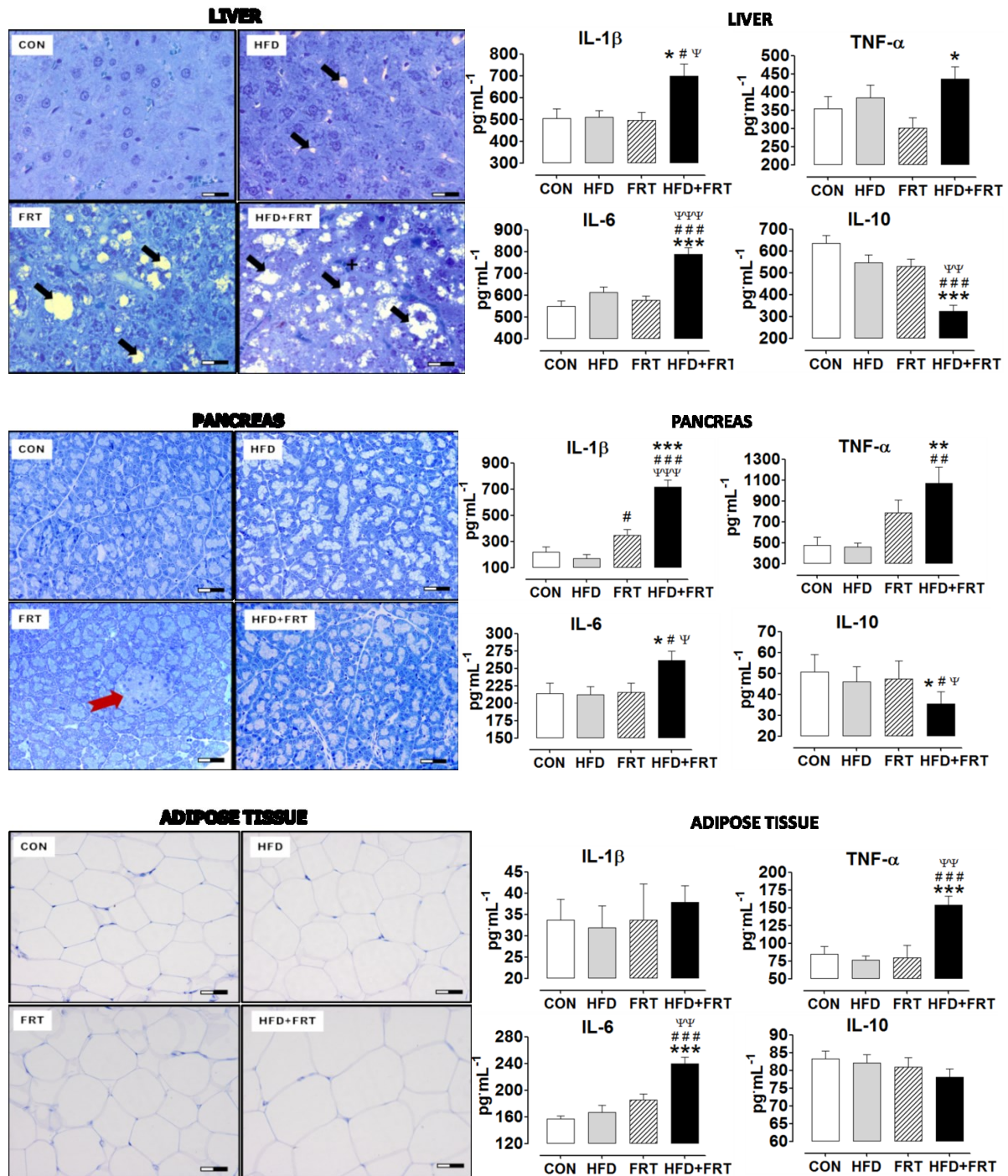


Figure 4. Sections of liver and pancreas fixed in glutaraldehyde stained with toluidine blue and cytokines levels of the CON, HFD, FRT and HFD+FRT groups. Mean (stander error mean); (➔): Lipids droplets; (+) Blood vessels; (➔): Islet of Langerhans; bars 50μm; * Significantly different from CON group; # Significantly different from HFD group; Ψ Significantly different from FRT group; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; Ψ $p < 0.05$; ΨΨ $p < 0.01$; ΨΨΨ $p < 0.001$;

The fructose-rich beverage ingested in combination of high-fat-diet also promoted significant increase in triglycerides compared to all the other groups and in the transaminases ratio compared with CON and HFD groups (table 1). Moreover, the rats fed with high-fat-diet and fructose-rich beverage showed increase in lipids droplets compared to CON and HFD groups (table 2). In liver and in the pancreas, the consumption of high-fat-diet combined with fructose-rich beverage increased inflammatory cytokines IL-1 β ($p = 0.005$; $F_{0.05;3;28} = 5.285$ and $p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 35.233$, respectively), IL-6 ($p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 18.14$ and $p = 0.039$; $F_{0.05;3;28} = 3.190$) and IL-6/IL-10 ratio (CON: 0.9 ± 0.1 ; HFD: 1.2 ± 0.1 ; FRT: 1.1 ± 0.1 ; HDF+FRT: 2.6 ± 0.3 ; $p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 21.54$ and CON: 5.2 ± 0.9 ; HFD: 5.3 ± 0.7 ; FRT: 5.6 ± 1.0 ; HFD+FRT: 7.2 ± 2.7 ; $p = 0.037$; $F_{0.05;3;28} = 3.088$, respectively) when compared to all the other groups (figure 4). Combined HFD and FRT also increased TNF- α in liver and pancreas compared to the CON group ($p = 0.024$; $F_{0.05;3;28} = 3.647$; $p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 7.450$, respectively) (figure 4).

Table 2. Morphometric parameters of the liver and pancreas for CON, HFD, FRT, and HFD-FRT groups.

	CON	HFD	FRUT	HFD+FRUT	<i>p</i>	<i>F</i> _{0.05;3;28}
Liver (%)						
Blood vessels	8.61 (0.55)	7.61 (0.53)	8.04 (0.35)	7.20 (0.44)	0.196	1.25
Lipids droplets	2.57 (0.66)	6.70 (2.34)	12.12 (2.60)*	17.06 (2.98)*** #	<0.001	7.42
Cytoplasm	80.18 (0.77)	77.10 (2.63)	70.65 (2.71)*	68.13 (2.92)**	0.005	5.33
Nucleus	8.63 (0.30)	8.52 (0.22)	8.18 (0.39)	7.48 (0.23)*	0.043	3.09
Area n. (μm ²)	11.24 (0.49)	11.16 (0.44)	11.09 (0.52)	10.94 (0.49)	0.123	1.92
Pancreas (%)						
Blood vessels	7.03 (0.31)	6.29 (0.10)	6.23 (0.07)	6.05 (0.20)	0.060	2.77
Ducts interm.	5.17 (0.23)	5.44 (0.41)	5.73 (0.27)	5.80 (0.20)	0.409	0.99
Exocrine P.						
Area n. (μm ²)	8.98 (0.55)	7.52 (0.50) **	6.95 (0.58)***	6.81 (0.60)***	<0.001	11.72
Nucleus (%)	9.29 (0.45)	9.14 (0.18)	9.29 (0.09)	9.27 (0.14)	0.973	0.07
Cytoplasm (%)	72.36 (1.15)	73.67 (1.60)	72.67 (0.61)	73.08 (0.54)	0.643	0.56
Endocrine P.						
Area n. (μm ²)	11.11 (0.67)	10.19 (0.74)	8.80 (0.57)*** #	8.27 (0.69)*** ###	<0.001	14.01
Nucleus (%)	0.95 (0.17)	0.97 (0.10)	0.92 (0.11)	0.91 (0.08)	0.981	0.05
Cytoplasm (%)	5.20 (0.74)	4.48 (0.37)	5.17 (0.49)	4.89 (0.39)	0.745	0.41

Area n.: area nuclear; * Significantly different from the CON group; # Significantly different from the HFD group; * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001; # *p* < 0.05; ### *p* < 0.001.

The consumption of fructose-rich beverage alone or combined with high-fat-diet also reduced the nuclear area on exocrine ($p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 11.72$) and endocrine portion ($p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 14.01$, table 4) without modifying the area of the Langerhans' islets.

For the adipose tissue, the consumption of high-fat-diet in combination with fructose-rich beverage promoted an increase in adipocyte area ($113271.10 \pm 11327.10 \mu\text{m}^2$ vs. $71975.52 \pm 3697.60 \mu\text{m}^2$; $p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 7.60$), inflammatory cytokines TNF- α ($p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 9.42$) and IL-6 ($p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 17.46$) and in the IL-6/IL-10 ratio (4.9 ± 0.2 vs. 2.1 ± 0.1 ; $p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 51.17$). Moreover, compared to the CON group, this combination of high-fat-diet and fructose-rich beverage also increased concentrations in gastrocnemius muscle of inflammatory cytokines, as TNF- α (35.1 ± 5.3 vs. $13.1 \pm 3.3 \text{ pg mL}^{-1}$; $p = 0.049$; $F_{0.05;3;28} = 2.96$), IL-6 (143.3 ± 4.6 vs. 119.0 ± 4.3 ; $p < 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 9.21$), IL-6/IL-10 ratio (1.8 ± 0.1 vs. 1.4 ± 0.1 ; $p = 0.001$; $F_{0.05;3;28} = 7.29$), and, IL- β (40.2 ± 13.3 vs. 19.7 ± 17.3 ; $p = 0.006$; $F_{0.05;3;28} = 5.09$).

DISCUSSION

The consumption of a high-fat-diet combined with a fructose-rich beverage for thirty days was effective in promoting metabolic and tissue alterations associated with insulin resistance such as an increase in adiposity and HOMA index, hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia. In addition, this short-term combination of high-fat diet with a fructose-rich beverage also promoted an elevation of inflammatory cytokines in the liver, pancreas, adipose tissue and skeletal muscle of studied rats.

The induction of insulin resistance through hypercaloric diets has been considered an experimental strategy of great ecological validity by promoting the metabolic alterations found in humans (BOCARSLY *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2017). In that manner, the consumption of fructose and high-fat diets are increasingly present in the nutrition habits of modern society.

Due to its high palatability and its high industrial use as a substitute sweetener for glucose or sucrose in the preparation of desserts, condiments and various beverages, including soft drinks and processed juices, the over-consumption of fructose in the world population increased by approximately 30% in the last few years contributing to increased risk development of insulin resistance and metabolic syndrome (REGY *et al.*, 2013; TOOP; GENTILI, 2016; NOLAN *et al.*, 2011; LOZANO *et al.*, 2016; CORTE *et al.*, 2018). Thus, in this perspective, the combination of a high-fat diet and a fructose-rich beverage proposed by

the present study mimics the habitual diet of the modern society and can be considered a useful, short-term model (for only 4 weeks) for inducing insulin resistance in Wistar rats.

Moreover, in the present study, the high-fat diet consumed in association with a fructose-rich beverage promoted an obesogenic status similar with the insulin resistance in humans, including an increased body weight and adiposity index, impaired glucose homeostasis and insulin sensitivity, and increased inflammatory status in the liver, pancreas, adipose tissue and skeletal muscle.

The relationship between insulin resistance and obesity has been already described in the literature. Several studies demonstrated that hypertrophy of adipocytes has been associated with the synthesis and secretion of inflammatory cytokines causing low-grade inflammation, increasing the risk of developing insulin resistance (KAHN *et al.*, 2006; WENSVEEN *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2017). This is due to the activation of inflammatory pathways, including the IKK β complex, c-Jun N-terminal Kinase and p38 MAPK (JNK1/MAPK8) that can cause phosphorylation of the substrate of the insulin receptor in serine, thus blocking the adequate cascade of insulin signaling in several tissues (De ALVARO *et al.*, 2004; ARKAN, *et al.*, 2005).

The consumption of a high-fat diet combined with a fructose-rich beverage also reduced the adiponectin-leptin ratio indicating an adipose tissue dysfunction. Leptin is an adipokine produced by adipose tissue that participates in the regulation of food intake and correlates closely with the total amount of body fat, being elevated in obese individuals and insulin resistance (BLUHER *et al.*, 2015). The leptin increase glucose uptake in skeletal muscle via the hypothalamic-sympathetic system axis and β -adrenergic mechanism and stimulates fatty acid oxidation via AMP-activated protein kinase (AMPK) playing a role pivotal of the glucose and lipid metabolism (MINOKOSHI *et al.*, 2012). In this sense, the resistance of leptin action present in obesity and insulin resistance promotes impaired the regulation of energy and reduction of glucose uptake in peripheral tissues contributing to the development of the diabetes mellitus (MEECK *et al.*, 2016).

The adiponectin is the most abundant peptide secreted by adipocytes, has direct actions in the liver, skeletal muscle, and the vasculature (ACHARI *et al.*, 2017). Adiponectin increase insulin sensitivity and stimulates fatty acid oxidation on skeletal muscle (NICHOLSON *et al.*, 2018), has a cardioprotective function, anti-inflammatory effects, and, protects against insulin resistance (STERN *et al.*, 2016). Therefore, adiponectin-leptin ratio

has been suggested as a marker of adipose tissue dysfunction strongly associated with insulin resistance (FRUHBECK *et al.*, 2018).

Hepatic insulin resistance has been considered a major contributor to fasting hyperglycemia in DM2 and is associated with accumulation of droplets lipids, inflammation and oxidative stress in the liver (MARINHO *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2017). The consumption of the fructose-rich beverage by itself increased glucose, insulin, and triglycerides levels and lipids droplets in the liver. However, when combined with high-fat-diet these alterations appeared in greater magnitude for glucose, insulin, and triglycerides levels, for HOMA index, transaminases ratio and for lipids droplets in the liver.

The relationship between the over-consumption of fructose and hepatic dysfunction has been associated with its metabolism in the liver due to high amounts of GLUT2 in this tissue (PEREIRA *et al.*, 2017). Thus in the cytoplasm, fructose can either contribute to the production of hepatic glucose (gluconeogenesis) or be rapidly metabolized through phosphorylation by the enzyme fructose kinase (TOOP; GENTILI, 2016). Therefore, excess fructose metabolism in hepatocytes can activate different signaling pathways, causing increased gluconeogenesis, oxidative stress, inflammatory cytokine synthesis, lipogenesis, cellular apoptosis, eNOS inhibition, hepatic steatosis and insulin resistance on the liver (MARINHO *et al.*, 2011; LOZANO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2017).

Although the physiological mechanisms involved in the additive effects of fructose consumption have not yet been completely elucidated, recently studies demonstrated that consumption of diet-rich fructose promoted additive effects to HFD consumption in the proteins involved in the stress of endoplasmatic reticulum, including GRP-78, XBP1 and CHOP in the liver and pancreas contributing to development of insulin resistance (BALAKUMAR *et al.*, 2016). Moreover, the consumption of fructose-rich beverage associated with HFD decreased carnitine palmitoyl transferase-1a (CPT1a) activity and fatty acid oxidation, impaired of mitochondrial size and function resulting in the metabolic dysregulation (SOFTIC *et al.*, 2019).

Although different experimental models involving the consumption of hypercaloric diets for longer periods have been used to induce insulin resistance in rodents (BARBOSA-DASILVA *et al.*, 2014; BALAKUMAR *et al.*, 2016; LOZANO *et al.*, 2016; KLEINERT *et al.*, 2018), in the present study, we demonstrated that consumption of beverage fructose-rich promoted additive effects to the consumption of HFD in several metabolic and inflammatory

markers contributing to the development of insulin resistance. Therefore, this diet manipulation (HFD+FRT) can be considered a useful, effective and time-sparing model for studying insulin resistance in rodents.

CONCLUSION

The consumption of a high-fat diet in combination with a fructose-rich beverage for only thirty days promotes impaired glucose and insulin metabolism, increased inflammatory status and modulates the liver, pancreas and adipose tissue morphometric parameters, therefore, demonstrating to be a useful, effective and short-term model for studying insulin resistance in rodents.

REFERENCES

- ACHARI, A.E.; JAIN, S.K. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1321, p. 1-17, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061321.
- ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetes Medicine**, v. 15, n. 7, p. 539-553, 1998.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION – ADA. Diagnosis and Classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 581-590, 2014.
- ARKAN, M. C.; HEVENER, A. L.; GRETEN, F. R.; MAEDA, S.; LI, Z. W.; LONG, J. M.; WYNshaw-BORRIS, A.; POLI, G.; OLEFSKY, J.; KARIN, M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 191-198, 2005.
- BALAKUMAR, M.; RAJI, L.; PRABHU, D.; SATHISHKUMAR, C.; PRABU, P.; MOHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, M. High fructose diet is a detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 423, n. 1, p. 93-104, 2016.
- BARBOSA-DA-SILA, S.; SARMENTO, I. B.; BARGUT, T. C. L.; SOUZA-MELLO, V.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Animal models of nutritional induction of type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Morphology**, v. 32, n. 1, p. 279-293, 2014.
- BLUHER, M.; MANTZOROS, C. S. From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. **Metabolism**, v. 64, n. 2015, p. 131-145, 2015.
- BOCARSLY, M. E.; POWELL, E. S.; AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. **Pharmacology Biochemistry and Behavioral**, v. 97, n. 8, p. 101–106, 2010.

CORT, K. W. D.; PERRAR, I.; PENCZNSKI, K. J.; SCHWINGSHACKL, L.; HERDER, C.; BUYKEN, A. E. Effect of dietary sugar intake on biomarkers of subclinical inflammation: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. **Nutrients**, v. 10, n. 606, p. 1-20, 2018.

De ALVARO, C.; TERUEL, T.; HERNANDEZ, R.; LORENZO, M. Tumor necrosis factor α produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor κ B kinase in a p38 MAPK-dependent manner. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 279, n.7, p. 17070–17078, 2004.

DESHPANDE, A. D.; HARRIS-HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. **Journal of the American Physical Therapy Association**, v. 88, n. 11, p. 1254-1264, 2008.

FLANAGAN, A. M.; BROWN, J. L.; SANTIAGO, C. A.; AAD, P. Y.; SPICER, L. J.; SPICER, M. T. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 19, n. 8, p. 505-513, 2008.

FRUHBECK, G.; CATALAN, V.; RODRIGUEZ, A.; GOMEZ-AMBROSI, J. Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk. **Adipocyte**, v. 7, n. 1, p. 57-62, 2018.

GHORBANZADEH, V.; MOHAMMADI, M.; DARIUSHNEJAD, H.; CHODARI, L.; MOHADDES, G. Effects of crocin and voluntary exercise, alone or combined, on heart VEGF-A and HOMA-IR of HFD/STZ induced type 2 diabetic rats. **Journal of Endocrinology Invest**, v. 1, n. 2, p. 1179-1186, 2016.

HORST, K. W.; SCHENE, M. R.; HOLMAN, R.; ROMIJN, J.; SERLIE, M. J. Effect of fructose consumption on insulin sensitivity in non diabetic subjects: A systematic review and meta-analysis of diet-intervention trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 6, p. 1562-1576, 2016.

HU, F. B. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 6, p. 1249-1257, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION – IDF. IDF Diabetes Atlas 2014. **Diabetes Atlas**. Sixth Edition. 2p., 2014.

INZUCCHI, S. E.; BERGENSTAL, R. M.; BUSE, J. B.; DIAMANT, M.; FERRANNINI, E.; NAUCK, M.; PERTERS, A. L.; TSAPAS, A.; WENDER, R.; MATTHEWS, D. R. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient centered approach. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. 140-149, 2015.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanism linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 4, p. 840-846, 2006.

KAWANO, K.; HIRASHIMA, T.; MORI, S.; SAITOH, Y.; KUROSUMI, M.; NATORI, T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Osaka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. **Diabetes**, v. 41, n. 11, p. 1422-1428, 1992.

KIM, M. K.; REAVEN, G. M.; KIM, S. H. Dissecting the relationship between obesity and hyperinsulinemia: role of insulin secretion and insulin clearance. **Obesity**, v. 25, n. 2, p. 378-383, 2017.

KLEINERT, M.; CLEMMENSEN, C.; HOFMMAN, S. M.; MOORE, M. C.; RENNER, S.; WOODS, S. C.; HUYPENS, P.; BECKERS, J.; ANGELIS, M. H.; SCHURMANN, A.; BAKHTI, M.; KLINGENSPOR, M.; HEIMAN, M.; CHERRINGTON, A. D.; RISTOW, M.; LICKET, H.; WOLF, E.; HAVEL, P. J.; MULLER, T. D.; TSCHOP, M. H. Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nature Review Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 140-162, 2018.

LOZANO, I.; WERF, R. V.; BIETIGER, W.; SEYFRITZ, E.; PERONET, C.; PINGET, M.; JEANDIDIER, N.; MAILLARD, E.; MARCHIONI, E.; SIGRIST, S.; DAL, S. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. **Nutrition and Metabolism**, v. 13, n. 15, p. 1-13, 2016.

MAHMOUD, A. M.; HOZAYEN, W. G.; SOLIMAN, H. A.; MOSTAFA, S. R. Enteromorpha flexuosa Improves Insulin Sensitivity and Metabolic Control in Fructose-Induced Diabetic Rats. **Journal of Endocrinology and Diabetes Obesity**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2015.

MARINHO, R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; DA SILVA, A. S. R.; BERTOLI, F. C.; COLANTONIO, E.; D'ALMEIDA, V.; PAULI, J. R. Endurance exercise training increase APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 3, p. 2917-2926, 2012.

MEEK, T.H.; MORTON, G. The role of leptin in diabetes: metabolic effects. **Diabetologia**, v. 59, n. 5, p. 928-932, 2016. DOI 10.1007/s00125-016-3898-3.

MINOKOSHI, Y.; TODA, C.; OKAMOTO, S. Regulatory role of leptin in glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 3, p. 562-568, 2012. DOI: [10.4103/2230-8210.105573](https://doi.org/10.4103/2230-8210.105573).

NICHOLSON, T.; CHURCH, C.; BAKER, D.J.; JONES, S.W. The role of adipokines in skeletal muscle inflammation and insulin sensitivity. **Journal of Inflammation**, v. 15, n. 9, p. 1-11, 2018. DOI: 10.1186/s12950-018-0185-8.

NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **Lancet**, v. 378, n. 9786, p. 169-181, 2011.

PEREIRA, R. M.; BOTEZELLI, J. D.; RODRIGUES, K. C. C.; MEKARY, R. A.; CINTRA, D. E.; PAULI, J. R. Fructose consumption in the development of obesity and the effects of different protocols of physical exercise on the hepatic metabolism. **Nutrients**, v. 9, n. 405, p. 1-21, 2017.

REED, M. J.; MESZAROS, K.; ENTES, L. J.; CLAYPOOL, M. D.; PINKET, J. G.; GADBOIS, T. M.; REAVEN, G. M. A new model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism**, v. 49, n. 11, p. 1390-1394, 2000.

REGY, J.; PADMAJA, G. Comparative Studies on the Production of Glucose and High Fructose Syrup from Tuber Starches. **International Research Journal of Biological Science**, v.1, n. 2, p. 68-75, 2013.

SOFTIC, S.; MEYER, J.G.; WANG, G.X.; GUPTA, M.J.; BATISTA, T.M.; LAURITZEN, H.P.M.M.; FUJISAKA, S.; SERRA, D.; HERRERO, L.; WILLOUGHBY, J.; FITZGERALD, K.; IKAYEVA, O.; CHRISTOPHER, B.N.; GIBSON, B.W.; SCHILLING, B.; COHEN, D.E.; KAHN, R. Dietary sugars alter hepatic fatty oxidation via transcriptional and post-

translational modifications of mitochondrial proteins. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 30, p. 735-753, 2019. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.09.003.

SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, L.; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. Combination of high-fat diet-fed and low dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Res.**, v. 2005, n. 52, p. 313-320, 2005.

STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 10, p. 770-784, 2016.

TOOP, C. R.; GENTILI, S. Fructose beverage consumption induced a metabolic syndrome phenotype in the rat: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 8, n. 577, p. 1-15, 2015.

WENSVEEN, F. M.; JELENIC, V.; VALENTIC, S.; WENSVEEN, T. T.; THEURICH, S.; GLASNER, A.; MENDRILA, D.; STIMAC, D.; WUNDERLICH, T.; BRUNING, J. C.; POLIC, B. NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation and insulin resistance. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 376-387, 2015.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 88-98, 2018.

APÊNDICE D - Original Article: Acute intake of cocoa flavanols not change physical performance but attenuates the hyperglycemia after aerobic exercise in conditions of insulin resistance

MELO, BP¹; OLIVEIRA JCC¹, ZACARIAS AC¹, CORDEIRO LMS², DOS SANTOS ML³, FERREIRA AVM⁴, WANNER SP¹, MEEUSEN R⁵, HEYMAN E⁶, AVELAR GF⁵, SOARES DD¹

1 – The Federal University of Minas Gerais, Department of Physical Education, Exercise Physiology Laboratory, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 Campus-Pampulha, Belo Horizonte, Brazil.

2 – Division of Endocrinology and Metabolism. Department of Medicine. University of Rochester Medical Center, 601 Elmwood Ave, Box 693 Rochester, NY 14642, Rochester, New York.

3 - Federal University of Minas Gerais, Department of Morphology, Cellular Biology Laboratory, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 Campus-Pampulha, Belo Horizonte, Brazil

4 – The Federal University of Minas Gerais. Department of Nutrition. Av. Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, 30130-100, Belo Horizonte, Brazil.

5 – Human Physiology Research Group, Faculty of Physical Education and Physical Therapy, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, 1050, Brussels, Belgium. romain.meeusen@vub.be.

6 - Univ. Lille, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7369 - URePSSS - Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société, F-59000 Lille, France.

Corresponding Author:

Prof^a. Phd. Danusa Dias Soares

Federal University of Minas Gerais

Department of Physical Education

Exercise Physiology Laboratory

Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 Campus-Pampulha, Belo Horizonte, Brazil.

Phone: +55 (31) 3409-2350

E-mail: danusa56@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: The time of exposure to hyperglycemia is one of the main contributing factors for the metabolic complications resulting from DM2. Although aerobic exercise with moderate and vigorous-intensity are widely recommended to people with DM2, depending on the duration of effort, this exercise can induce, even temporarily, a status of hyperglycemia after physical exercise. Embora a suplementação dos flavanóis do cacao podem contribuir para o metabolismo glicêmico e o aumento da capacidade aeróbia, os seus efeitos sobre . We aimed to investigate the acute effects of supplementation of cocoa flavanols on aerobic performance and their effects on glucose during recovery after aerobic exercise in conditions of obesity and insulin resistance. **Methods:** Twenty male Wistar rats (230-250 g) were allocated into two groups. Obesity-associated Insulin resistance (IR, n = 10) was induced by a high-fat diet (HFD) combined with a fructose-rich beverage taken *ad libitum* for 30 days. The learn rats with normal glucose tolerance (CON, n =10) received standard diet for the same period of time. After insulin resistance induction, the rats of both groups (CON and IR) performed two successive incremental maximal treadmill running tests, after consuming either cocoa flavanols supplementation (NATUREX[®] Powder, Avignon France) or placebo, in randomized order. The placebo solution was equilibrated with cocoa flavanols supplementations in caffeine and theobromine content (compounds (g/100g⁻¹): 0.89g caffeine, 5.01g theobromine). Both cocoa flavanols supplementation and placebo were administered by oral gavage using the same quantity of 45 mg·kg⁻¹ body mass. Capillary (tail) glucose concentration was measured before, immediately after and 3, 5, 10, 15, 30 and 60 min after aerobic performance through a portable glucometer. The physical performance was evaluated by the peak oxygen uptake (VO_{2peak}), velocity peak (V_{peak}) and total external work obtained durtin incremental running test. **Results:** The VO_{2peak}, V_{peak} and total external work were not different when compared IR and CON rats whatever the supplementation used. Although the acute supplementation of cocoa flavanols did neither change VO_{2peak}, V_{peak} and total external work, attenuated the hyperglycemic status in the IR rats after incremental running test (F = 20.302; *p* < 0.001), maintaining the glucose concentration at similar values compared with CON rats supplemented with placebo (F = 28.638; *p* < 0.001). Moreover, the IR rats supplemented with cocoa flavanols restored to basal levels of glucose concentration at 15 minutes after incremental test running (F = 40.929; *p* < 0.001). **Conclusion:** Acute intake of cocoa flavanols prior to physical exercise did not change aerobic performance, but, attenuated the hyperglycemia after aerobic exercise with incremental-intensity, demonstrating, therefore, an important strategy to reduce the time of exposure to hyperglycemia after physical exercise in conditions of obesity and insulin resistance.

Keywords: Type 2 diabetes; polyphenols, glucose, physical exercise.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes (DM2) is a complex disease resulting from genetics, epigenetics, and environmental factors. Physical inactivity and consumption of hypercaloric diet have been considered the main contributors to the increase of incidence of obesity and insulin resistance in the world population (SKYLER *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2018). Chronic hyperglycemia resulting from insulin resistance can cause several metabolic complications and represents a risk of the development of cardiovascular diseases (RAGHAVAN, *et al.*, 2019). The low cardiorespiratory fitness contributes to an increased risk of mortality and has been associated with obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome (LEITE *et al.*, 2009; MYERS *et al.*, 2019).

Physical exercise represents an effective non-pharmacological strategy for glycaemic control management and improvement of cardiorespiratory fitness (YATES *et al.*, 2007; UMPIERRE *et al.*, 2013). Monitoring glycemic at before, during and, after physical exercise is essential to avoid hypoglycemia or hyperglycemia in people with DM2. Although aerobic exercise with moderate and vigorous-intensity are widely recommended to people with DM2 (COLBERG *et al.*, 2016), the increase in glycogenolysis and hepatic gluconeogenesis resulting from aerobic exercises with vigorous-intensity can induce, even temporarily, a status of hyperglycemia after physical exercise (YARDLEY, *et al.*, 2017). In this sense, since, the time of exposure to hyperglycemia is one of the main contributing factors for the metabolic complications resulting from DM2, strategies to mitigate and/or reduce the time of exposure to hyperglycemia after physical exercise with vigorous-intensity, have been considered of great relevance.

Diets rich in polyphenols, specifically flavanols, a group of flavonoids found in beverages such as green tea and wine, vegetables and in large amounts in cocoa, have been demonstrated to be beneficial to health (BRAVO, 1998; VINAYAGAM; XU, 2015). The bioactive monomers of cocoa, including (-)-epicatechin and (+)-catechin, have demonstrated has antioxidant (HUSSAIN *et al.*, 2016), anti-inflammatory (SHAY *et al.*, 2015) properties. Moreover, cocoa flavanols are able to improve vasoreactivity and endothelial function (LIN *et al.*, 2016; HERMANN *et al.*, 2006; WEST *et al.*, 2014) and consequently decrease risk of cardiovascular disease and insulin resistance (CURTIS *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2015; NING REN, *et al.*, 2019).

Due to the previously described benefits, several studies have investigated the effects of cocoa flavanols supplementation on physical performance of non-diabetic athletes (SOMERVILLE *et al.*, 2017; DECROIX *et al.*, 2018). However, its effects on physical performance in populations suffering from insulin resistance have still been never investigated. Although cocoa flavanols can activate signaling pathways involved in glucose uptake in peripheral tissues, improving glycemic metabolism (MARTIN *et al.*, 2016), increased oxidative phosphorylation and aerobic capacity (RAMOS *et al.*, 2017), there are no reports in the literature whether acute supplementation of cocoa flavanols can improve physical performance and/or attenuate hyperglycemia after performing an aerobic exercise with incremental intensity in conditions of obesity and insulin resistance. Therefore, the objective of this study was to investigate the acute effects of supplementation of cocoa flavanols on aerobic performance and their effects on glucose during recovery after aerobic exercise in conditions of obesity and insulin resistance. We hypothesized that acute supplementation of cocoa flavanols will attenuate the hyperglycemia status after aerobic exercise with incremental intensity.

METHODS

Animal and Ethics Care

This study was conducted in accordance with Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation and approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) for the Care and Use of Laboratory Animals (CEUA-UFMG, protocol n°. 110/2016). Twenty male Wistar rats (230-250 g), provided by the Institute of Biological Science of the UFMG were used in the experiments. The rats were housed in collective cages (4 rats in each cage) under controlled temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) and light conditions (lights on from 05:00 am until 07:00 pm) and remained for five days for adaptation to the bioterium of the Physiology Exercise Laboratory.

Experimental design

Obesity-associated Insulin resistance (IR, $n = 10$) was induced by a high-fat diet (HFD, macronutrient composition: 48.39% Fat, 21.54% protein; 30.06% carbohydrates; density calories $457.9 \text{ kcal}\cdot 100\text{g}^{-1}$) combined with a fructose-rich beverage (solution 30%; Synth[®]), taken *ad libitum* for 30 days. Glucose intolerance was confirmed by oral glucose tolerance test (OGTT). The learn rats with normal glucose tolerance (CON, $n = 10$) received standard diet (macronutrient composition: 8.53% Fat, 38.47% protein; 52.99% carbohydrates;

density calories $263.94 \text{ kcal} \cdot 100\text{g}^{-1}$; Presence[®]-Brazil) for the same period of time (MELO *et al.*, dates in submission).

After insulin resistance induction, the rats of both groups (CON and IR) performed 2 successive incremental maximal treadmill running tests, after consuming either cocoa flavanols supplementation or placebo, in randomized order. The 2 incremental running tests were separated by a washout period of 48 hours resting. The supplementation (cocoa flavanols or placebo) was performed by an experient researcher (BPM) one hour before each incremental running test and aerobic performance was evaluated by another researcher (ACZ), so that this study was blinded to the researcher. Capillary (tail) glucose concentration was measured before, immediately after and 3, 5, 10, 15, 30 and 60 min after aerobic performance through a portable glucometer (Accu-Check Performa[®], Roche Diagnostic, France). To determine lactate concentrations, blood samples (25 μl) were collected before and immediately after the incremental running test through heparinized capillary tubes, which were homogenized in eppendorf tubes containing 75 μl sodium fluoride and then analyzed by lactimeter (YSI 1500 - Sport Lactate Analyzer).

Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

The glucose intolerance was confirmed by oral glucose tolerance test performed after 6 hour of fasting. Blood samples were collected from the tail vein at baseline (0), 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after oral gavage of glucose solution ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 40% solution, Synth[®]). Glucose concentration was measured with a glucometer (Accu-Check Performa[®], Roche Diagnostic, France).

Placebo and Cocoa flavanols supplementation

The supplementation of cocoa flavanols consisted in flavanol-enriched cocoa powder (compounds ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$): 1.39g (+)- catechin; 6.10g (-)- epicatechin, 0.89g caffeine; 5.01g theobromine, NATUREX[®] Powder, Avignon France) dissolved in water ($18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). The placebo solution was equilibrated with cocoa flavanols supplementations in caffeine and theobromine content (compounds ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$): 0.89g caffeine, 5.01g theobromine). Both cocoa flavanols supplementation and placebo were administered by oral gavage using the same quantity of $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ body mass.

Familiarization with running and incremental running test

The rats were initially familiarized with running on a treadmill (Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain) by 10 minutes during five consecutive days before the first

incremental test. The velocity was adjusted daily (10, 10, 11, 13 and 15 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$), with maintained inclination (5%) and electrical stimulus of 0.2 mA (adapted from PRIMOLAS-GOMES, 2009).

The incremental test running started at a velocity of 10 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ and consisted of increments of 1 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ every three minutes. Fatigue was determined through permanence the rats on the electrical stimulation grid for 10 uninterrupted seconds. The oxygen uptake was continuously measured during incremental test by open-flow indirect calorimetry (Gas Analyzer Panlab/Havard Apparatus, Cornellia Spain). The peak oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{peak}}$) was considered the highest value obtained during the incremental protocol. The external work was calculated in Joules as $\text{bm} \times g \times s \times \sin\theta \times t$, where bm is the animal's body mass (kg), g is the acceleration of gravity ($9.8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$), s is the treadmill speed ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$), θ is the angle of treadmill inclination, and t is the time spent each satage (SOARES *et al.*, 2019).

Statistical Analyses

Shapiro-Wilk and Levene's tests were used to assess the normality and homoscedasticity of data, respectively. The results are expressed as mean values \pm mean standards deviations except when noted in the figures. Capillary glucose concentrations in response to OGTT obtained before and after the period of insulin resistance induction were compared between *moments* (i.e. before vs. after) and according to *time* using two-way ANOVAs with repeated measures on *time*. The area under the curve (AUC) of glucose in response to OGTT was compared between both moments by test T of Tukey.

The comparison of the acute effects of cocoa flavanols and placebo solution supplementation, implemented in randomized order, on aerobic performance parameters ($\text{VO}_{2\text{peak}}$, V_{peak} and total external work) were performed by two-way ANOVAs, considering *group* (CON or IR) and *supplementation* (PLA or COCOA) with repeated measures on *supplementation*. The glucose and lactate concentration before and during recovery after the incremental running test was compared by three-way ANOVA considering *group* (CON or IR), *supplementation* (PLA or COCOA) and *time* with repeated measures on *supplementation* and *time*. The area under the curve (AUC) of capillary glucose concentration before and after the incremental running test was compared two-way by ANOVA considering *group* (CON or IR) and *supplementation* (PLA or COCOA) with repeated measures on *supplementation*. All statistical analyses were performed using the SigmaPlot software (version 11.0, SYSTAT SOFTWARE, USA), adopting a significance level of $\alpha = 5\%$ ($p < 0.05$).

RESULTS

After the thirty of diet intervention, the rats fed with high-fat diet and fructose-rich beverage (IR) increased the body mass (401.37 ± 39.23 g vs. 380.81 ± 27.61 g; $p = 0.041$), presented impaired an metabolism of glucose (Figure 2a) and an increase in the area under the curve in response to OGTT (Figure 2b) when compared with CON rats.

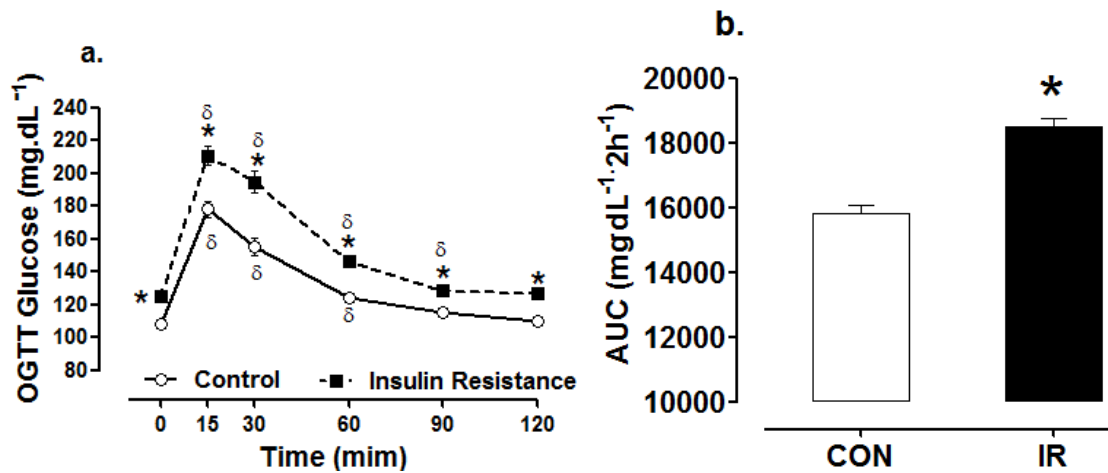
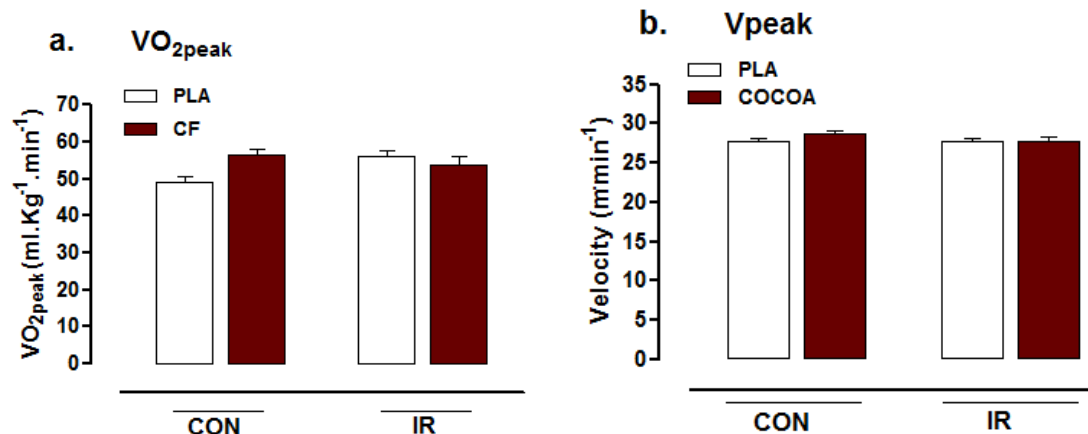


Figure 1. Oral Glucose Tolerance Test after 30 days of consumption of standard feed (CON) or high-fat diet combined with fructose-rich beverage (IR). Datas expressed as mean and standard error of the mean. * $p < 0.05$: Difference between groups; δ $p < 0.05$: Difference from baseline (0); **Main effects by ANOVA:** Time: $F = 149.297$; $p < 0.001$; Group: $F = 46.675$; $p < 0.001$; Group \times Time: $F = 4.872$; $p < 0.001$; **AUC Glucose:** Tukey's test: $t = -5.622$; $p < 0.001$.

VO_{2peak} , V_{peak} and total external work were not different when compared IR and CON rats whatever the supplementation used (Figure 2a-c). The acute supplementation of cocoa flavanols did neither change VO_{2peak} , V_{peak} and total external work. Lactate concentration increased after incremental running test in both groups but in a greater amplitude in the IR rats when compared with CON group, and this independently of cocoa flavanols supplementation (figure 2d).



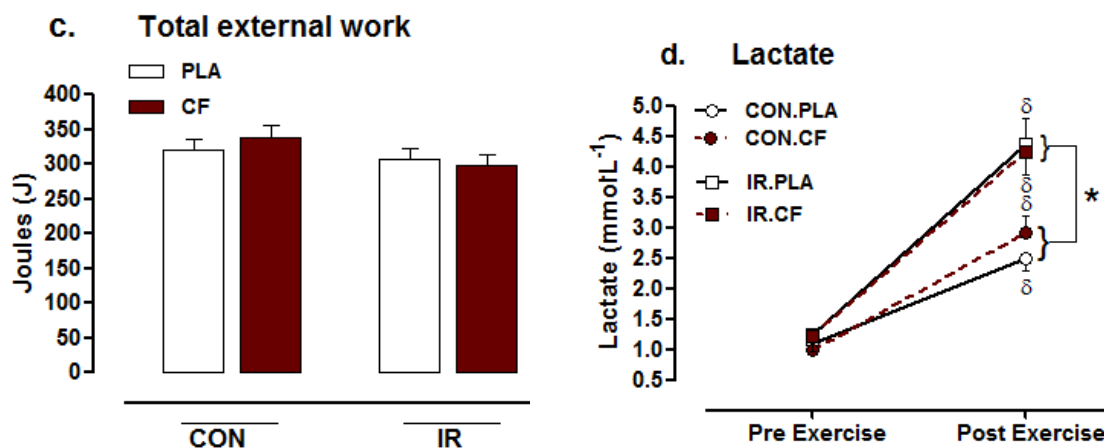


Figure 2. Acute effect of cocoa flavanols supplementation on physical performance parameters and lactate concentration obtained by incremental running test in CON and IR rats. Datas expressed as mean and standard error of the mean. VO_{2peak} : Oxygen Uptake Peak; V_{peak} : Velocity Peak. * $p < 0.05$: Difference between groups; δ : $p < 0.05$: Difference from pre exercise. **Lactate: Main effects by ANOVA: Moment:** $F = 160.093$; $p < 0.001$; **Group:** $F = 44.204$; $p < 0.001$; **Group \times Moment:** $F = 8.468$; $p = 0.004$.

The IR rats supplemented with placebo presented chronic hyperglycemic after incremental test running when compared with CON rats under the same condition (Figure 3a). The acute supplementation of cocoa flavanols attenuated the hyperglycemic status in the IR rats after incremental running test, maintaining the glucose concentration at similar values compared with CON rats supplemented with placebo (Figure 3a,b). Moreover, the IR rats supplemented with cocoa flavanols restored to basal levels of glucose concentration at 15 minutes after incremental test running. The CON rats, when supplemented with cocoa flavanols, also restored to basal levels of glucose concentration at 10 min after incremental running test running.

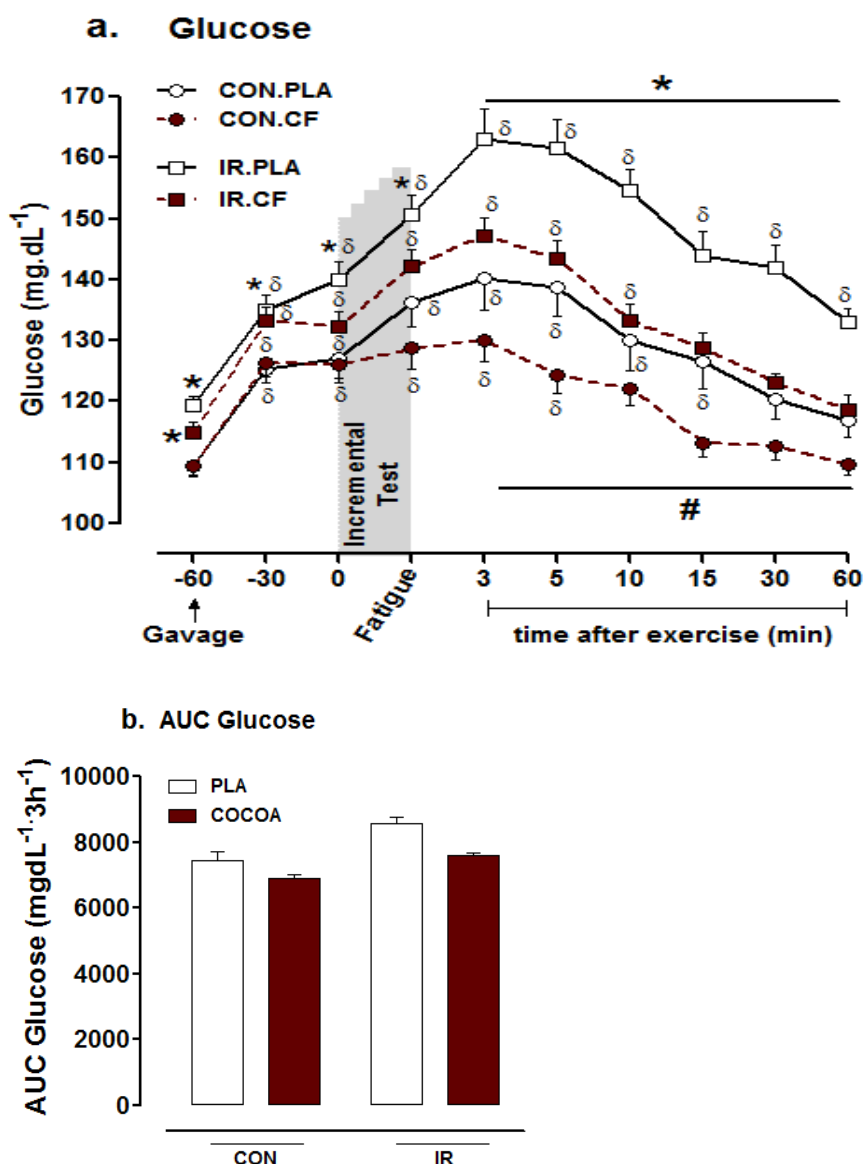


Figure 3. Acute effects of cocoa flavanols supplementation on glucose concentration before and after incremental test running. Data expressed as mean and standard error of the mean. * $p < 0.05$: Difference between groups (IR vs. CON); δ : $p < 0.05$: Difference from baseline; # $p < 0.05$: Difference from placebo. **Glucose: Main effects by ANOVA:** Group: $F = 327.480$; $p < 0.001$; Supplementation: $F = 91.624$; $p < 0.001$; Time: $F = 40.929$; $p < 0.001$; Group \times Supplementation: $F = 14.589$; $p < 0.001$; Group \times Time: $F = 3.081$; $p = 0.001$; Supplementation \times Time: $F = 4.035$; $p < 0.001$; **AUC: Main effects by ANOVA:** Group: $F = 28.638$; $p < 0.001$; Supplementation: $F = 20.302$; $p < 0.001$.

DISCUSSION

The acute intake of cocoa flavanols prior to physical exercise did not change aerobic performance, but, attenuated the status hyperglycemia-induced by incremental test running in insulin resistant rats. To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate the effects of supplementation of cocoa flavanols on the attenuation of hyperglycemia in response

to exercise with incremental intensity, demonstrating, therefore, that the supplementation of cocoa flavanols prior to physical exercise can be an important strategy to reduce the time of exposure to hyperglycemia in conditions of obesity and insulin resistance after high-intensity physical exercise.

Although the present study has not explored the physiological mechanisms involved in mitigating hyperglycemia after exercise, it is possible that cocoa flavanols have increased the peripheral vasodilatation and glucose uptake in peripheral tissues and / or attenuate glycolysis and gluconeogenesis after exercise. Thus, such effects could contribute to attenuate the hyperglycemic response after physical exercise and decrease, therefore, the time of exposure to hyperglycemia in conditions of obesity and insulin resistance.

The putative mechanism involved in the glucose uptake mediated by cocoa flavanol can be associated with the increase in the peripheral vasodilatation mediated by an increase in nitric oxide bioavailability and decrease of reactive oxygen species. The cocoa flavanols decrease inactivation of nitric oxide (NO) to peroxynitrite by to inhibit of L-arginase enzyme, promotes the activation of the enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by which converts L-arginine to L-citrulline increasing of the release of NO in the endothelium vascular (HEISS *et al.*, 2006; FRAGA *et al.*, 2011). Endothelium-derived nitric oxide is a potent vasodilator and has roles important in cardiovascular homeostasis (FARAH *et al.*, 2018). Therefore, the increased peripheric vasodilatation favors insulin and glucose delivery in several tissues contributing to glucose uptake (KATZ *et al.*, 2011; STRAT *et al.*, 2016).

The activation of signaling pathways involved in the uptake of glucose in peripheral tissues, as well as in the inhibition of the process of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis after physical exercise could also be involved in the attenuation of hyperglycemia after physical exercise through the supplementation prior with the cocoa flavanols. Studies have shown that supplementation with cocoa flavanols can increase phosphorylation of IRS-1 and Akt proteins in peripheral tissues (MARTIN *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2017). The Akt protein is involved in several intracellular signaling pathways, including, growth, protein synthesis, survival, migration, proliferation, and glucose metabolism (WHITEMAN *et al.*, 2002). In the skeletal muscle and adipose tissue, the phosphorylation of the Akt protein in the tyrosine substrate promotes the translocation of GLUT4 to membrane cellular increasing the glucose uptake (WHITEMAN *et al.*, 2002; PETERSEN *et al.*, 2017). Specifically in the liver, the phosphorylation of Akt protein leads to

inhibition of the glycogen synthase kinase-3 (GSK3) an enzyme inhibitory of the glycogen synthase and consequently, inhibition of glycolysis (BEUREL *et al.*, 2015). Moreover, the phosphoenolpyruvate carboxy-kinase (PEPCK) also can be inhibited by Akt which leads to reducing the gluconeogenesis and consequently the hepatic production of glucose (CORDEIRO-HERRERA, *et al.*, 2013).

Since the time of exposure to hyperglycemia is considered one of the main contributors to the increase in metabolic complications resulting from insulin resistance, the results of the present study demonstrated that the supplementation of cocoa flavanols prior to high-intensity physical exercise can be considered an efficient strategy to mitigate hyperglycemia after the effort. Thus, these effects can also be associated with the supplementation time prior to physical exercise. The bioactive cocoa monomers, such as +(-)catechin and -(-)epicatechin, are found in large quantities in the plasma of rats and humans after 60 and 90 minutes of supplementation and can staying for up 6 to 8 hours, respectively (RICHELLE *et al.*, 1999; DONOVAN *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2011; ELLINGER *et al.*, 2020). In the present study, physical exercise started at the peak concentration of bioactive cocoa monomers in plasma and its effects on glucose uptake may have been added to those of physical exercise during recovery.

Although the cocoa flavanols can promote several physiological and metabolic changes that could contribute to the increase in cardiorespiratory capacity and consequently increase physical performance, such as, the improves vascular function, reduction of exercise-induced oxidative stress, and alteration of the lipids and carbohydrate utilization during physical exercise (DECROIX *et al.*, 2018), in the present study, the VO_{2peak} , V_{peak} , and total external work were similar when comparing the placebo and cocoa flavanols supplementation, independently of the CON or IR rats. Other studies also failed to demonstrate any acute effect of cocoa flavanols on aerobic performance in athletes trained (DAVISON *et al.*, 2012; STELLINGWERFF, *et al.*, 2014) demonstrating that acute effects of cocoa flavanols intake are too small to improve exercise performance (DECROIX *et al.*, 2018).

In the present study, both groups displayed an increase in the lactate concentration after incremental runner test, however, the IR rats presented higher values when compared to CON rats, independently of cocoa flavanols intake. Blood lactate is a measure of the gap between energy expenditure and oxidative capacity, used clinically to indicate energy imbalance associated with vigorous exercise, hypoxia, and ischemia (CRAWFORD *et al.*,

2010). During the incremental running test, the intensity of physical exercise increased over time. In the moderate and higher intensities, the contraction of skeletal muscle, the sympathetic nervous activity, the glycogenolysis, and glycolysis are increased (BROOKS, 1997), therefore, the anaerobic glycolytic pathway becomes predominant contributing to increase lactate concentration.

In insulin resistance, the inadequate oxidative capacity at the cellular level (YARIBEYGI *et al.*, 2019), including, the reduction of the mitochondrial size and density (KELLEY *et al.*, 2002), the reduction of the oxidative genes expression (LOWELL *et al.*, 2005), and reduction of the oxidative phosphorylation and aerobic capacity (HESSELINK *et al.*, 2016) can contribute to increase of blood lactate concentration during physical exercise. Moreover, since the lactate concentration during physical exercise is given by the balance between production and removal, it is possible that an inefficient buffering or impaired removal system can also contribute to a higher concentration of lactate in cases of obesity and insulin resistance (BERHANE *et al.*, 2015).

Although the physiological mechanisms involved in the cellular response, still need to be elucidated in future studies, the results of the present study demonstrated a practical response to the effectiveness of the previous supplementation with cocoa flavanols in attenuating hyperglycemia after physical exercise with incremental intensity, therefore reducing the time of exposure to hyperglycemia after physical exertion in conditions of obesity and insulin resistance.

CONCLUSION

Acute intake of cocoa flavanols prior to physical exercise did not change aerobic performance, but, attenuated the status hyperglycemia-induced by incremental test running, demonstrating, therefore, an important strategy to reduce the time of exposure to hyperglycemia after physical exercise in conditions of obesity and insulin resistance.

REFERENCES

BERHANE, F.; FITE, A.; DABOUL, N.; AL-JANABI, W.; MSALLATY, Z.; CARUSO, M.; LEWIS, M.K.; YI, Z.; DIAMOND, M.P.; ABOU-SAMRA, A.B; SEYOUUM, B. Plasma lactate levels increase during hyperinsulinemic euglycemic clamp and oral glucose tolerance test. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, p. 1-7, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/102054>.

BEUREL, E.; GRIECO, S.F.; JOPE, R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions and diseases. **Pharmacology & Therapeutic**, v. 2014, n. 148, p. 114-131, 2015. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.

BROOKS, G.A.; Importance of the “crossover” concept in exercise metabolism. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 1997, n. 24, p. 889-895, 1997.

COLBERG, S.R.; SIGAL, R.J.; YARDLEY, J.E.; RIDDEL, M.C.; DUNSTAN, D.W.; DEMPSEY, P.C.; HORTON, E.S.; CASTORINO, K.; TATE, D.F. Physical activity/exercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 39, n. 6, p. 2065-2079, 2016. DOI: 10.2337/dc16-1728.

CORDEIRO-HERREIRA, I.; MARTÍN, M.A.; BRAVO, L.; GOYA, L.; RAMOS, S. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via AKT and AMPK in HepG2 cells. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 2013, n. 57, p. 974-985, 2013. DOI 10.1002/mnfr.201200500.

CRAWFORD, S.O.; HOOGEVEEN, R.C.; BRANCATI, F.L.; ASTOR, B.C.; BALLANTYNE, C.M.; SCHIMIDT, M.I.; YOUNG, F.H. Association of blood lactate with type 2 diabetes: the Atherosclerosis risk communities carotid MRI study. **International Journal of Epidemiology**, v. 2010, n. 39, p. 1647-1655, 2010. DOI:10.1093/ije/dyq126.

DAVISON, G.; CALLISTER, R.; WILLIAMSON, G.; COOPER, K.A.; GLEESON, M. The effect acute pre-exercise dark chocolate consumption on plasma antioxidant status, oxidative stress and immunoendocrine responses to prolonged exercise. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 1, p. 69-79, 2012. DOI: 10.1007/s00394-011-0193-4.

DECROIX, L.; SOARES, D.D.; MEEUSEN, R.; HEYMAN, E.; TONOLI, C. Cocoa flavanols supplementation and exercise: A systematic review. **Sports Medicine**, n. 48, v. 4, p. 867-892, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0849-1>.

DONOVAN, J.; CRESPIY, V.; OLIVEIRA, M.; COOPER, K.A.; GIBSON, B.; WILLIAMSON, G. (+)-Catechin is more bioavailable than (-)-Catechin: Relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. **Free Radical Research**, v. 40, n. 10, p. 1029-1034, 2006. DOI: 10.1080/10715760600868545.

ELLINGER, S.; REUSCH, A.; HENCKES, L.; RITTER, C.; ZIMMERMANN, B.; ELLINGER, J.; GALENSA, R.; STEHLE, P.; HELFRICH, H.P. Low plasma appearance of (+)-catechin and (-)-epicatechin compared with Epicatechin after consumption of beverages prepared from nonalkalized or alkalinized cocoa – A randomized, double-blind trial. **Nutrients**, v. 12, n. 231, p. 1-16, 2020. DOI: 10.3390/nu12010231.

FARAH, C.; MICHEL, L.Y.M.; BALLIGAND, J.L. Nitric oxide signaling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 1, p. 292-316, 2018. DOI: 10.138/nrcardio.2017.224.

FRAGA, C.G.; LITTERIO, M.C.; PRINCE, P.D.; CALABRÓ, V.; PIOTRKOWSKI, B.; GALLEANO, M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 63-67, 2011. DOI: 10.3164/jcbn.11010FR.

HEISS, C.; SCHROETER, H.; BALZER, J.; KLEINBONGARD, P.; MATERN, S.; SIES, H.; KELM, M. Endothelial function, nitric oxide and cocoa flavanols. **Journal of Cardiovascular and Pharmacology**, v. 47, n. 2, p. s128-s135, 2006.

HESSELINK, M.C.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V.; SCHRAUWEN, P. Skeletal muscle mitochondria as target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, p. 633-645, 2016. DOI: 10.1038/nrendo.2016.104.

KATZ, D.L.; DOUGHTY, K.; ALI, A. Cocoa and chocolate in human health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 10, p. 2779-2811, 2011. DOI: 10.1089/ars.2010.3697.

KELLEY, D.E.; HE, J.; MENSHIKOVA, E.V.; RITOV, V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2944-2950, 2002. DOI:10.2337/diabetes.51.10.2944.

LEITE, S.A.O.; MONK, A.M.; UPHAM, P.A.; CHACRA, A.R.; BERGENSTAL, R.M. Low cardiorespiratory fitness in people at risk for type 2 diabetes: early marker for insulin resistance. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 1, n. 8, p. 1-6, 2009.

LOWELL, B.B.; SHULMAN, G.I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, v. 307, n. 21, p. 384-387, 2005. DOI: 10.1126/science.1104343.

MARTIN, M.A.; GOYA, L.; RAMOS, S. Antidiabetic actions of cocoa flavanols. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 60, n. 8, p. 1756-1769, 2016. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500961>.

MYERS, J. KOKKINOS, P.; NYELIN, E. Physical activity, cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. **Nutrients**, v. 11, n. 1652, p. 1-18, 2019. DOI: 10.3390/nu11071652.

PETERSEN, M.C.; VATNER, D.F.; SHULMAN, G.I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. **Nature Review Endocrinology**, v. 13, n. 10, p. 572-587, 2017. DOI:10.1038/nrendo.2017.80.

PRÍMOLA-GOMES, T. N.; CAMPOS, L. A.; LAUTON-SANTOS, S. BALTHAZAR, C. H.; GUATIMOSIM, S. CAPETTINI, L. S.; LEMOS, V. S.; COIMBRA, C. C.; SOARES, D. D.; CARNEIRO-JUNIOR, M. A.; QUINTAO-JUNIOR, J. F.; SOUZA, M. O.; CRUZ, J. S.; NATALI, A. J. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. **Journal Applied Physiology**, v. 107, n. 2, p. 593-598, 2009. DOI: 10.1152/jappphysiol.91218.2008.

RAGHAVAN, S.; VASSY, J. L.; HO, Y.K.; SONG, R.J.; GAGNON, D. R.; CHO, K.; WILSON, P.W.F.; PHILIPS, L.S. Diabetes mellitus-related all causes and cardiovascular mortality in a national cohort of adults. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 4, p. 1-21, 2019. DOI: 10.1161/JAHA.118.011295.

RAMOS, S.; MARTIN, M.A.; GOYA, L. Effects of cocoa antioxidants in type 2 diabetes mellitus. **Antioxidants**, v. 6, n. 84, p. 1-16, 2017. doi:10.3390/antiox6040084.

RICHELLE, M.; TAVAZZI, I.; ENSLEN, M.; OFFORD, EA. Plasma kinectins in man of Epicatechin from black chocolate. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 22-26, 1999. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1600673.

SOARES, A.D.N.; WANNER, S.P.; MORAIS, E.S.S.; HUDSON, A.S.R.; MARTINS, F.S.; CARDOSO, V.N. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* increases the maximal oxygen consumption and maximal aerobic speed attained by rats subjected to an incremental-speed exercise. **Nutrients**, v. 11, n. 2352, p. 1-11, 2019. DOI: 10.3390/nu11102352.

SOMERVILLE, V.; BRINGANS, C.; BRAAKHUIS, A. Polyphenols and performance: a systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 47, n. 8, p. 1589-1599, 2017. DOI: 10.1007/s40279-017-0675-5.

STELLINGWERFF, T.; GODIN, J.P.; CHOU, C.J.; GRATHWOHL, D.; ROSS, A.B.; COOPER, K.A.; WILLIAMSON, G.; GORETTA, L.A. The effects of acute dark chocolate consumption on carbohydrate metabolism and performance during rest and exercise. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 39, n. 2, p. 173-182, 2014.

STRAT, K.M.; ROWLEY IV, T.J.; SMITHSON, A. T.; TESSEM, J.S.; HULVER, M.W.; LIU, D.; DAVY, K.P.; NEILSON, A.P. Mechanism by which cocoa flavanols improve metabolic syndrome and related disorders. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 35, n. 2016, p. 1-21, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.12.008>.

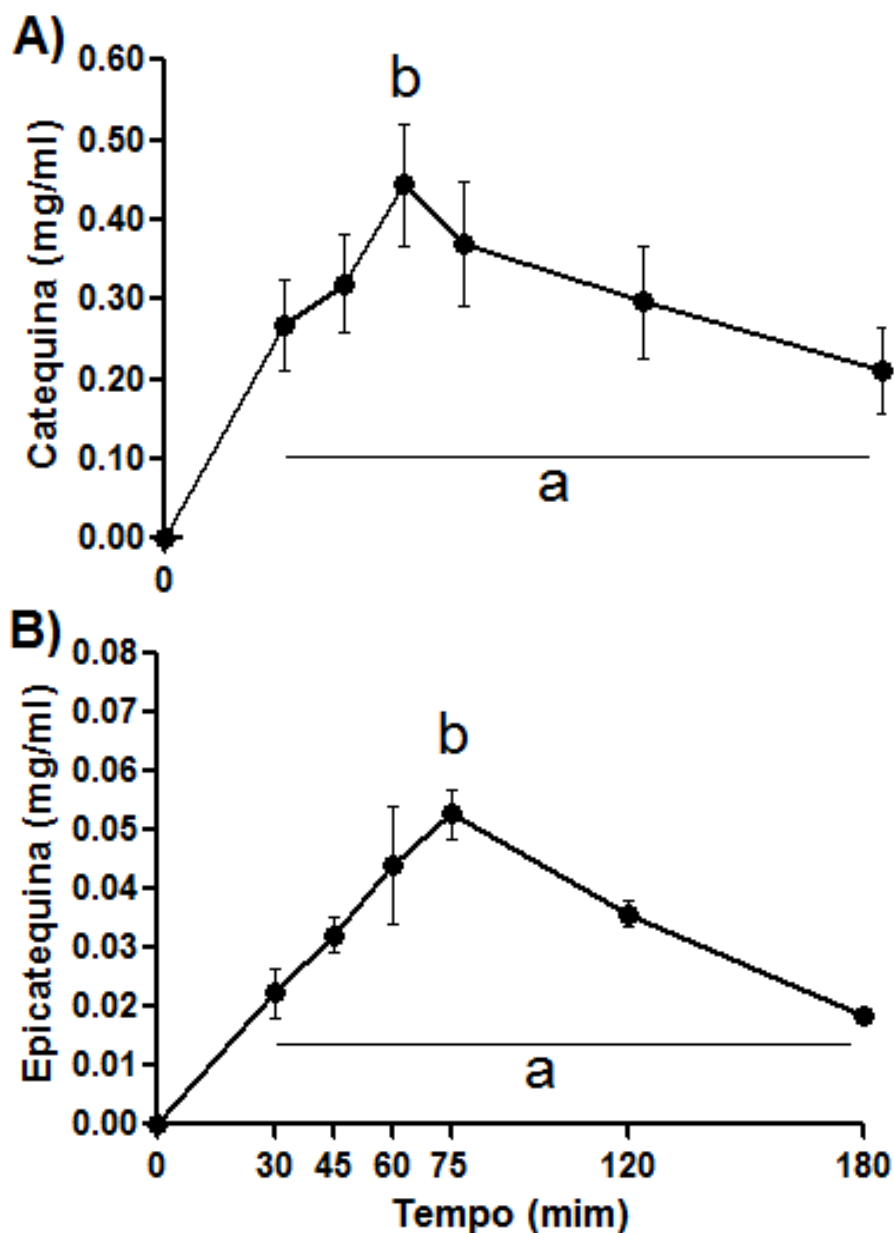
WHITEMAN, E.L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M.J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 10. 2002.

XIE, L.; LI, XN.; JIANG, DX.; ZHANG, D. Determination and pharmacokinetic study of Catechin in rat plasma by HPLC. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 1, n. 4, p. 297-301, 2011. DOI: 10.1016/j.jpha.2011.09.004.

YARDLEY, J. E.; COLBERG, S.R. Update on management of type 1 diabetes and type 2 diabetes in athletes. **Current Sports Medicine Reports**, v. 16, n. 1, p. 38-44, 2017. DOI: 10.1249/JSR.000000000000327.

YARIBEYGI, H.; ATKIN, S.L.; SAHEBKAR, A. Mitochondrial dysfunction in diabetes and the regulatory roles of antidiabetic agents on the mitochondrial function. **Journal of Cellular Physiology**, v. 2019, n. 234, p. 8402-8410, 2019. DOI: 10.1002/jcp.27754.

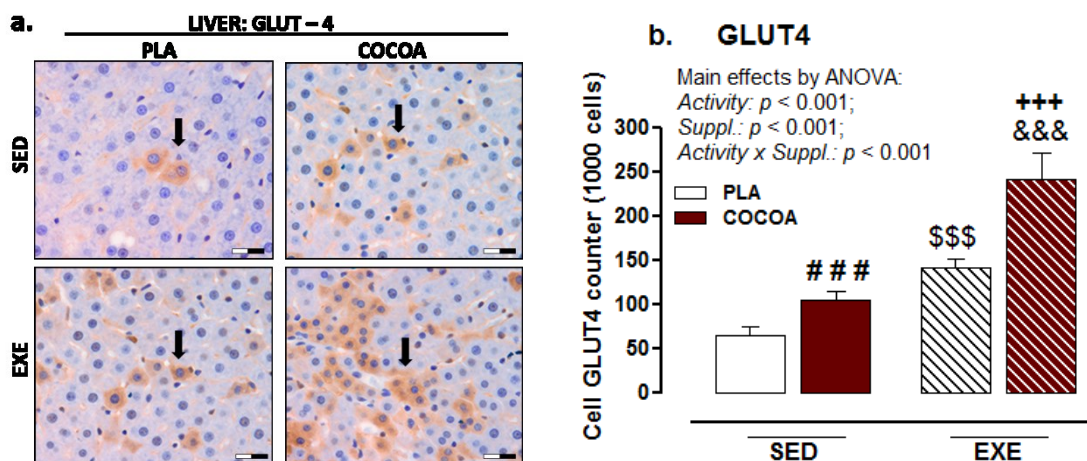
APENDICE E - Concentração de catequina e epicatequina no plasma de ratos Wistar após a gavagem oral de solução com flavanóis do cacau (dose $45\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de massa corporal, NATUREX, Avignon, France).



Fonte: TEIXEIRA *et al.*, dados não publicados

Figura 19. Concentração de (A) epicatequina e (B) catequina ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) ao longo do tempo.
a diferença significativa em relação ao baseline (0)
b diferença significativa em relação aos demais momentos.

APENDICE F – Efeitos crônicos da suplementação dos flavanóis do cacau e do treinamento aeróbico sobre GLUT4 no músculo gastrocnêmio de ratos resistentes à insulina



Dados estão expressos em média e erro padrão da média. (➔): Expressão de GLUT4; Análise post hoc para efeito de atividade: \$\$\$ $p < 0,001$ para PLA.SED vs. PLA.EXE; Análise post hoc para efeito de suplementação: ### $p < 0,001$ para PLA.SED vs. COCOA.SED. Análise post hoc para efeito de atividade: +++: $p < 0,001$ para COCOA.SED vs COCOA.EXE; Análise post hoc para efeito de suplementação: &&&: $p < 0,001$ para PLA.EXE vs COCOA.EXE;

Figura 20. GLUT4 no músculo gastrocnêmio de ratos resistentes à insulina após oito semanas de intervenção com suplementação de flavanóis do cacau e/ou treinamento aeróbico com intensidade moderada.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG)**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 110 / 2016, relativo ao projeto intitulado “ECODIA: Exercício, cognição, cacau e diabetes - Efeitos do exercício e da suplementação de flavonóis do cacau em ratos diabéticos tipo 2.”, que tem como responsável Danusa Dias Soares, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 22/08/2016. Este certificado espira-se em 22/08/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 110 / 2016, related to the Project entitled “ECODIA: Exercise, cocoa, cognition and Diabetes- Effects of exercise and cocoa flavonols supplementation in diabetic rats type 2.”, under the supervision of Danusa Dias Soares, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 22/08/2016. This certificate expires in 22/08/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 22/08/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: [\(31\) 3499-4516](tel:(31)3499-4516) – Fax: [\(31\) 3499-4592](tel:(31)3499-4592)
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B - Certificado de capacitação no uso e manejo de animais de laboratório



**República Federativa do Brasil
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas**

O Diretor do Instituto de Ciências Biomédicas, nos termos do artigo 74, parágrafo único, inciso 5, alínea "b", do Estatuto da Universidade de São Paulo, certifica que

Bruno Pereira Melo

de nacionalidade brasileira,
portador da cédula de identidade RG nº 11999089 MG,
nascido a 5 de fevereiro de 1989 e natural do Estado de Minas Gerais,
concluiu o



**Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão:
Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório**

E, para que possa gozar de todos os direitos e prerrogativas legais, outorga-lhe o presente
Certificado.

São Paulo, 12 de agosto de 2019

**Presidente da Comissão de Cultura e
Extensão Universitária**

Alda Maria Backx Noronha Madeira

Diretor

Luis Carlos de Souza Ferreira

Código de controle: W6J5-2JZQ-CJQQ-EYVF

Período do Curso: 02/08/2019 a 08/08/2019
Carga Horária: 60:00 horas
Frequência: 100.00%
Área de Conhecimento: Manejo de Animais
Avaliação Final: Aprovado

Credenciamento junto ao MEC através da Portaria nº 48, de 22 de janeiro de 2013.

ANEXO C - Análise bromatológica da ração padrão



Relatório de Análises 4872/2019.0

Proposta Comercial: PC1109/2019.1

Data de Publicação: 04/09/2019 17:11

Identificação Conta	
Cliente: Bruno Pereira Melo	CNPJ/CPF: 088.873.456-51;
Endereço: Rua Maria Francisca Gomes, 150 Apto 201 - Ouro Preto - Belo Horizonte - Minas Gerais - CEP: 31.340-025 - Brazil	

N° Amostra: 4872-1/2019.0 - Amostra 01 - Ração Presence	
Tipo de Amostra: Ração	
Data Coleta: 21/09/2019 12:00	Data Recebimento: 21/09/2019 16:32
Lote: -	A Amostra Está em Embalagem Adequada?: Adequada
Data de Fabricação: -	Data de Validade: -
Marca: -	Lacre: -
Peso/Volume: -	Responsabilidade da Amostragem: Cliente

Resultados Analíticos

Físico Químico					
Análise	Resultado	LQ	Incerteza	Referência	Data Análise
Carboidratos	34,97 g/100g	0,24	-	Portaria n° 108 de 04/Set/1991 do Mapa publicado no D.O.U 17/Set/ 1991 Método 34	04/09/2019
Lípidos	2,50 g/100g	0,18	-	IAL, 4ª edição. Método 032/IV	22/08/2019
Proteína Bruta	25,39 g/100g	0,22	-	IAL, 4ª edição. Método 037/IV	22/08/2019
Cinza	8,39 g/100g	0,19	-	IAL, 4ª edição. Método 018/IV	22/08/2019
Umidade a 105°C	8,99 g/100g	0,02	-	IAL, 4ª edição. Método 012/IV	22/08/2019

Notas
<p>Legendas</p> <p>NA: Não se aplica.</p> <p>LQ: Limite de Quantificação.</p> <p>SMWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd. Edition.</p>

Supervisora de Laboratório
Juliana Corrêa Meneses da Silva
Responsável pela publicação

Dr. Jorge Barquete
CRF 8-2090

Chave de Validação: 09270550b36645809e3d0383de08a4c0

A validação deste documento pode ser realizada em: portal.mylimsweb.com.

ANEXO D - Análise bromatológica da ração high-fat



Relatório de Análises 4873/2019.0

Proposta Comercial: PC1109/2019.1

Data de Publicação: 04/09/2019 17:12

Identificação Conta	
Cliente: Bruno Pereira Melo	CNPJ/CPF: 088.873.458-51;
Endereço: Rua Maria Francisca Gomes, 150 Apto 201 - Ouro Preto - Belo Horizonte - Minas Gerais - CEP: 31.340-025 - Brazil	

Nº Amostra: 4873-1/2019.0 - Amostra 02 - Ração HFD	
Tipo de Amostra: Ração	
Data Coleta: 21/09/2019 12:00	Data Recebimento: 21/09/2019 16:33
Lote: -	A Amostra Está em Embalagem Adequada?: Adequada
Data de Fabricação: -	Data de Validade: -
Marca: -	Laore: -
Peso/Volume: -	Responsabilidade da Amostragem: Cliente

Resultados Analíticos

Físico Químico					
Análise	Resultado	LQ	Incerteza	Referência	Data Análise
Carboidratos	34,30 g/100g	0,24	-	Portaria nº 108 de 04/Set/1991 do Mapa publicado no D.O.U 17/Set/ 1991 Método 34	04/09/2019
Lipídeos	24,62 g/100g	0,18	-	IAL, 4ª edição. Método 032/IV	22/08/2019
Proteína Bruta	24,86 g/100g	0,22	-	IAL, 4ª edição. Método 037/IV	22/08/2019
Cinza	6,31 g/100g	0,19	-	IAL, 4ª edição. Método 018/IV	22/08/2019
Umidade a 105°C	5,72 g/100g	0,02	-	IAL, 4ª edição. Método 012/IV	22/08/2019

Notas
Legendas NA: Não se aplica. LQ: Limite de Quantificação. SMWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd. Edition.

Supervisora de Laboratório
Juliana Corrêa Menezes da Silva
Responsável pela publicação

Dr. Jorge Barquete
CRF 6-2090

Chave de Validação: 6b6aae42d09946b58927acb4624188cd

A validação deste documento pode ser realizada em: portal.mylimsweb.com.