Helena Angélica Pereira Batatinha

Exercício aeróbio crônico reduz o acúmulo de gordura hepático, mas promove inflamação no fígado de camundongos PPAR-alpha knockout, via inibição do PPAR-gama.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Tecidual do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2015

Helena Angélica Pereira Batatinha

Exercício aeróbio crônico reduz o acúmulo de gordura hepático, mas promove inflamação no fígado de camundongos PPAR-alpha knockout, via inibição do PPAR-gama.

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof^oDr. José Cesar Rosa Neto

Versão Original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Batatinha, Helena Angelica Pereira.

Exercício aeróbio crônico reduz o acúmulo de gordura hepático, mas promove inflamação no fígado de camundongos PPAR-alpha knockout, via inibição do PPAR-gama / Helena Angelica Pereira Batatinha. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Imunometabolismo.

Versão do título para o inglês: Aerobic exercise decreases NAFLD, but promotes liver inflammation in PPAR-alpha knockout mice via PPAR-gamma inhibition.

1. Fígado gordo 2. Obesidade 3. Exercício aeróbio I. Rosa Neto, Prof. Dr. José Cesar II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0119/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Helena Angelica Pereira Batatinha.

Título da Dissertação: Exercício aeróbio crônico reduz o acúmulo de gordura hepático, mas promove inflamação no fígado de camundongos PPAR-alpha knockout, via inibição do PPAR-gama.

Orientador(a): Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **112** nas fls. **11** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **José César Rosa Neto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos do exercício físico nas alterações imuno-metabólicas hepáticas induzidas por dieta hiperlipídica em camundongos PPAR-₊*" do qual participam o(s) aluno(s) **Camila Oliveira de Souza, Alexandre Abilio de Souza Teixeira, Edson Alves de Lima Junior, Helena Angélica Pereira Batatinha**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **10.10.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 11 de outubro de 2013.

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

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

Aos meus pais,

Ao meu irmão

A meus amigos

A todos que me ajudaram, de alguma maneira,
neste processo

Agradecimentos

À minha mãe e ao meu pai, Matilde e Ricardo, por todo amor, toda dedicação, por cada palavra de incentivo, pelo apoio incondicional, por serem meus modelos e minha guia

Ao meu irmão, Júlio, pelo amor e por ser meu melhor parceiro

A todos meus amigos, em especial a Gabi, Carol e Alice, pelo apoio, pela amizade verdadeira e pelos momentos memoráveis

Ao meu Orientador, José Cesar Rosa Neto (Zeca), por acreditar no meu potencial, pela paciência e dedicação durante todo o processo

Ao Erico Caperuto, meu querido professor, por me inserir no mundo da pesquisa e por me fazer acreditar que eu era capaz

Aos colegas do laboratório pelo auxílio e pela parceria durante esses dois anos

Ao departamento de Biologia Celular e do desenvolvimento pelo apoio estrutural

A FAPESP, pelo apoio financeiro

A todos meus familiares, muito obrigada!

RESUMO

Batatinha HAP. Exercício aeróbio crônico reduz o acúmulo de gordura hepático, mas promove inflamação no fígado de camundongos PPAR-alpha knockout, via inibição do PPAR-gama. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015

A doença do Fígado gordo (NALFD) é uma das principais patologias de fígado na atualidade, podendo progredir para cirrose e hepatocarcinoma. Alguns estudos reportam os efeitos benéficos do treinamento aeróbio crônico em reverter a NAFLD. Objetivo: Nós verificamos se o treinamento aeróbio crônico melhora o quadro de resistência à insulina, inflamação e esteatose hepática causados pela dieta hiperlipídica (HF) e se o PPAR-alpha está envolvido neste processo. Métodos: Animais selvagens C57BL6 (WT) e knockout para PPAR α (KO) foram alimentados com dieta padrão (SD) ou HF durante 12 semanas, os animais submetidos a dieta HF foram treinados na esteira durante as 8 últimas semanas de dieta, metade dos animais KO treinados receberam ainda 15mg/kg/dia de rosiglitazona durante o mesmo período de treinamento. Todos os animais foram avaliados quanto a resposta a glicose e a insulina (ITT e GTT), níveis de AST, TAG e colesterol total no soro, conteúdo hepático de TAG, citocinas (ELISA), expressão gênica (qRT-PCR) e expressão proteica (WESTERN BLOT). Resultados: A exposição crônica a dieta HF aumentou acúmulo de TAG hepático, levando a NALFD, aumentou níveis de AST, resistência periférica à insulina e índice de adiposidade. O treinamento reduziu todos estes parâmetros em ambos os genótipos de animais. O desenvolvimento da NAFLD não foi associada com a inflamação, entretanto os animais KO treinados apresentaram uma resposta inflamatória exacerbada, que foi causada provavelmente pela redução na expressão de PPAR γ , pois quando esses camundongos foram tratados com rosiglitazona eles apresentaram melhora no quadro inflamatório e na resistência à insulina. Conclusão: Concluímos que o exercício diminuiu os danos causados pela dieta HF independente do PPAR α , provavelmente por um aumento na oxidação periférica de ácidos graxos; e que a ausência do PPAR α junto com um estímulo de estresse (exercício) levam a queda na expressão de PPAR γ , e a uma resposta inflamatória exacerbada, que é revertida pela administração da rosiglitazona.

Palavras chave: Treinamento aeróbio crônico. PPAR α . NAFLD. Inflamação. Resistência à insulina. Obesidade. PPAR γ .

ABSTRACT

Batatinha HAP. Aerobic Exercise decreases NAFLD, but promotes liver inflammation in PPAR-alpha knockout mice via PPAR-gamma inhibition [Master's Thesis (Cellular and tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015

The nonalcoholic fat liver disease (NAFLD) is one of the main liver diseases today, and may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Some studies have shown the beneficial effects of aerobic exercise on reverse NAFLD. *Aim:* Here we verify whether chronic aerobic exercise improve the insulin resistance, liver inflammation and steatohepatitis caused by a high fat diet (HF) and whether PPAR α is involved in these actions. *Methods:* C57BL6 wild type (WT) and PPAR- α knockout (KO) mice fed with a standard (SD) or HF during 12 weeks, the HF mice were trained on a treadmill during the last 8 weeks, half of KO trained animals also received 15mg/kg/day of rosiglitazone during the same 8 weeks of training, all mice were evaluated glucose and insulin tolerances (GTT and ITT), serum levels of AST, TAG and total cholesterol, hepatic content of triacylglycerol, cytokines (ELISA), gene expression (qRT-PCR) and protein expression (WESTRN BLOT). *Results:* Chronic exposure to HF diet increased triacylglycerol accumulation in the liver, leading to NAFLD, and increase in aminotransferase in the serum, peripheral insulin resistance, and adiposity index. Exercise reduced all this parameters in both animals genotype. The lipid accumulation in the liver was not associated with inflammation, however KO mice when trained presented a huge inflammatory response that was probably caused by a decrease on PPAR γ expression. When these mice were treated with rosiglitazone, they presented decrease on inflammatory cytokines as well as improvement on insulin sensitivity. *Conclusion:* We conclude that exercise improved the damage caused by a HF independently of PPAR α ; apparently, by a peripheral fatty acid oxidation in the skeletal muscle, and the absence of PPAR α together with a stress condition (exercise) leads to decrease on PPAR γ expression and a huge inflammatory response, which was attenuated by rosiglitazone administration.

Keywords: Chronic aerobic exercise. PPAR α . NAFLD. Inflammation. Insulin resistance. Obesity. PPAR γ .

Lista de tabelas

Tabela 1 - Composição dietética das dietas com baixo teor de gordura (SD) ou rica em gordura (HF)	27
Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na análise do PCR-tempo real.	32

Lista de figuras

Figura 1 – Via inflamatória.....	18
Figura 2 - AMPK modulada pelo exercício físico e seus mecanismos de ação.....	20
Figura 3 - Mecanismo de ação do PPAR α inibindo NF-kB e aumentando a transcrição de genes do metabolismo oxidativo.....	22
Figura 4 - Desenho experimental 1.	26
Figura 5 - Desenho experimental 2	26
Figura 6 - Ganho de peso corporal dos Camundongos WT e KO	34
Figura 7 - Peso do tecido adiposo (T.A.) Retroperitoneal (A), subcutâneo (B), epididimal (C), respectivo índice de adiposidade (D) e marrom (E), de camundongos WT e KO.....	35
Figura 8 - Colesterol total (A), Triacilglicerol (B) e ácido graxo livre (C) no soro de camundongos WT e KO	36
Figura 9 - Glicemia basal (A), Insulina (B), no soro de camundongos WT e KO	37
Figura 10 - Curva glicêmica após a administração de glicose em animais WT (A) ou KO (B), e as respectivas AUCs (C). de camundongos WT e KO	37
Figura 11 - Curva de decaimento da glicose após a administração de insulina (kITT) de camundongos WT e KO	38
Figura 12 - Concentração de triglicérides extraídos do fígado (A), Aspartato transaminase (AST) no soro (B) e peso do fígado (C) de camundongos WT e KO ..	39
Figura 13 - Cortes histológicos de fígado corados por hematoxilina e eosina (HE), aumento médio (20X). Histologia do fígado de animais WT e PPAR α knockout (KO)	40
Figura 14 - Expressão gênica de FAS (A), SREBP1 (B) e ACC (C), relativizado pelo RPL-19, no Fígado de camundongos WT e KO	41
Figura 15 - Expressão proteica da ACC fosforilada em serina 79, relativizada pela ACC total, no Fígado de camundongos WT e KO	41
Figura 16 - Expressão gênica de FAS (A), SREBP1 (B) e ACC (C), relativizado pelo RPL-19, no Fígado de camundongos WT e KO	41
Figura 17 - Expressão proteica da AMPK fosforilada em tirosina 172, relativizada pelo GAPDH, no Fígado de camundongos WT e KO.....	42
Figura 18 - Expressão gênica de NLRP-3 (A), Caspase-1 (B), NF-kB (C), TLR-4 (D) e IL-1 β (E) relativizado pelo RPL-19, no Fígado de camundongos WT e KO	43
Figura 19 - Níveis de IL- β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-12 (D) e TNF- α (E) e MCP-1 (F) no Fígado de camundongos WT e KO	44
Figura 20 - Níveis de IL-4 (A), IL-10 (B) e IL-1Ra (C) no Fígado de camundongos WT e KO	45
Figura 21 - Expressão gênica (A) e proteica (B e C) de PPAR γ , no Fígado de camundongos WT e KO	46

Figura 22 - Peso dos camundongos KO.....	47
Figura 23 - Peso do tecido adiposo (T.A.) Retroperitoneal (A), subcutâneo (B), epidídimal (C), respectivo índice de adiposidade (D) e marrom (E), de camundongos KO	47
Figura 24 – Níveis de glicemia basal (A), colesterol total (B), Triacilglicerol (C) e ácido graxo livre (D) no soro de camundongos KO	48
Figura 25 – Curva glicêmica após a administração de glicose (A), respectiva área sob a curva (B) e constante de decaimento da glicose após administração de insulina (kITT) (C) em camundongos KO	49
Figura 26 - Níveis de IL- β (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e MCP-1 (D) no Fígado de camundongos KO.....	50
Figura 27 – expressão gênica de NF-kB (A), IL- β (B), TLR-4 (C) e Myd88 (D) no Fígado de camundongos KO.....	51
Figura 28 – expressão gênica de PPAR γ (A), PGC-1 α (B) e FAS (C) no Fígado de camundongos KO.....	52
Figura 29 – expressão gênica de CPT-1 (A), SCD-1 (B) e SREBP-1 (C) no Fígado de camundongos KO.....	53
Figura 30 – Expressão gênica de F4/80 (A) e CD86 (B) no Fígado de camundongos KO	53

Lista de abreviaturas

ACO - Acil-CoA oxidase
ACC – Acetil-CoA carboxilase
AG - Ácido graxo
AGL - Ácido graxo livre
AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
AST - Aspartato transaminase
AUC – Área sob a curva
CACT – Carnitina acilcarnitina translocase
CPT1 – Carnitina palmitoil transferase 1
CRP - Proteína C reativa
DM2 - diabetes *mellitus* tipo 2
E1 - Desenho experimental 1
E2 - Desenho experimental 2
FAS - Ácido graxo sintase
GTT - Teste de tolerância à glicose
HIF-1 α – Fator indutor de hipóxia 1 alpha
HSL - Lipase hormônio sensível
HF - Dieta hiperlipídica
HFT - Dieta hiperlipídica + treino
HFT RG - Dieta hiperlipídica + treino + rosiglitazona
IL- Interleucina
IRS - Receptor de insulina
ITT - Teste de tolerância à insulina
KITT - Constante de desaparecimento da glicose no plasma
KO - Camundongos *knockout* para PPAR α
LPL - Lipoproteína Lipase
MCP-1 – Proteína quimioatrativa de monócitos
mRNA – RNA mensageiro
NAFLD - Doença do fígado gordo não alcoólica
NASH - Esteatose hepática
NF-kB - Fator nuclear kB

PGC-1 α - do inglês "*peroxisomeproliferator-activated receptor γ co-activator 1 α* "

PPAR - Proliferadores de peroxissoma

SD - Dieta balanceada

SCD-1 – do inglês "*Stearoyl-CoA desaturase-1*"

SEREBP1 – do inglês "*sterol regulatory element-binding protein 1*"

TAG - Triacilglicerol

TAEP - Tecidos adiposos epidídimal

TARP - Tecido adiposo retroperitoneal

TASC - Tecido adiposo subcutâneo

TLR-4 – Receptor toll-like 4

TNF- α – Fator de necrose tumoral –alpha

TNFR – Receptor de TNF

TRLs - Triglicerídeos ricos em lipoproteína

VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade

WT - Camundongos C57BL/6J

Sumário

1	Introdução	16
2	Objetivos	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	Justificativa	24
4	Métodos e atividades de pesquisa desenvolvidas	25
4.1	Protocolo experimental	25
4.1.1	<i>Desenhos experimentais e Administração das dietas</i>	25
4.1.2	<i>Treinamento Aeróbio crônico</i>	27
4.1.3	<i>Teste de exaustão</i>	28
4.1.4	<i>Administração da Rosiglitazona</i>	28
4.1.5	<i>Peso e composição corporal, ingestão alimentar e peso dos órgãos</i>	28
4.1.6	<i>Procedimentos analíticos</i>	29
4.1.7	<i>Histologia do fígado</i>	29
4.1.8	<i>Dosagem dos níveis de Triacilglicerol no fígado</i>	30
4.1.9	<i>Avaliações da responsividade à insulina</i>	30
4.1.10	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	31
4.1.11	<i>PCR-tempo real</i>	31
4.1.12	<i>Western blotting</i>	32
4.2	Análise Estatística	33
5	Resultados	33
5.1	Efeitos do treinamento Aeróbio crônico sobre o peso corporal e o peso dos tecidos dos animais	33
5.2	Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre o perfil lipídico, no soro	35
5.3	Efeito do treinamento aeróbio crônico sobre o perfil glicêmico e a resposta à insulina	36
5.4	Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre parâmetros da esteatose hepática	38
5.5	Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre as vias do metabolismo de ácidos graxos no fígado	40
5.6	Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre a inflamação hepática	42
5.7	Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre a expressão de PPAR γ no fígado	45
5.8	Efeitos da administração de rosiglitazona sobre o peso corporal e o peso dos tecidos dos animais KO	46

5.9	Efeitos da administração de rosiglitazona sobre o perfil glicêmico e lipídico no soro e sobre a resposta periférica à insulina dos animais KO	48
5.10	Efeitos da administração de rosiglitazona sobre a inflamação hepática dos animais KO	49
5.11	Efeitos da administração de rosiglitazona sobre a expressão de PPAR γ e seus genes alvos.	51
6	Discussão	54
7	Conclusão	61
	Referências ¹	62

1 Introdução

A obesidade é sem dúvida nenhuma, a doença com maior avanço em número de casos dos últimos trinta anos, representando um grave problema para saúde pública, afetando tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (1). Estudos epidemiológicos apontam que aproximadamente 69% da população dos Estados Unidos apresentam excesso de peso, sendo classificados como sobrepeso ($25 \leq \text{IMC} \leq 30 \text{ kg/m}^2$) 37% desses indivíduos e 32% como obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (1). No Brasil, a prevalência de adultos com sobrepeso, em um período de 34 anos (1975-2009), aumentou quase três vezes para homens e duas vezes para as mulheres, sendo que no mesmo período a incidência da obesidade para o gênero masculino aumentou mais de quatro vezes e para o feminino mais de duas vezes (2).

Desde a década de 80, observa-se uma grande associação entre a obesidade e o desenvolvimento de outras co-morbidades como hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (3). Muitos estudos evidenciam, como fator central desta associação, a inflamação sistêmica crônica de baixo grau, que acarreta no desenvolvimento da síndrome metabólica diminuindo a qualidade e a expectativa de vida (4) (5)

Farooq e colaboradores (2015) (6) demonstraram uma correlação positiva entre o quadro de síndrome metabólica e os níveis de proteína C reativa (CRP), importante marcador clínico de inflamação, bem como com a circunferência da cintura, os níveis de glicose em jejum e os valores de HOMA-IR que demonstram resistência à insulina. Em concordância, camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 24 semanas apresentam inflamação no tecido adiposo e desenvolvem um quadro de resistência periférica à insulina e esteatose hepática (4)

O fígado desempenha papel de destaque na homeostase da glicose, sendo um dos primeiros órgãos afetados pela obesidade e resistência à insulina. Alterações hepáticas na ação da insulina promovem efeitos severos nas vias metabólicas da glicose, aumentando a concentração plasmática desta, e contribuindo para o desenvolvimento da DM2 (7). Contudo, além das alterações no metabolismo da glicose, a obesidade e resistência à insulina promovem diversas alterações nas funções hepáticas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos (AG), como aumento na captação e na síntese *de novo* de AG, inibição da β -oxidação mitocondrial

e redução da liberação de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) (8). Esses efeitos aumentam os ácidos graxos livres (AGLs) na circulação e favorecem o desenvolvimento da doença do fígado gordo não alcoólica (NAFLD), que se trata de uma deposição ectópica de triglicerídeos no parênquima dos hepatócitos (9-10). A NAFLD surge como uma das doenças de fígado mais comum, sendo sua evolução uma das principais causas da esteatose hepática (NASH) e da cirrose (11).

Além das alterações no metabolismo hepático, induzidas pela obesidade, a hipertrofia do tecido adiposo parece ser também um link entre essa co-morbidade e o desenvolvimento da NAFLD. O acúmulo exacerbado de TAG nos adipócitos leva o tecido adiposo a uma situação de hipóxia por falta de oxigênio. Esses dois fatores induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de quimioatração, como TNF- α , MCP-1, HIF-1 α , que sinalizam para o recrutamento de macrófagos e outras células do sistema imune, exacerbando ainda mais o quadro inflamatório (12)

O TNF- α liberado pelo tecido adiposo, além de prejudicar a via de sinalização da insulina e aumentar a inflamação sistêmica, também estimula a ação da lipase hormônio sensível (HSL), enzima responsável por hidrolisar o TAG, o que aumenta a liberação de AGL na corrente sanguínea e seu influxo para o fígado, contribuindo ainda mais com o desenvolvimento da NAFLD (13)

Sugere-se que a inflamação sistêmica crônica tem uma participação central na patogênese da resistência à insulina relacionada à obesidade, que acarreta no desenvolvimento da doença do fígado gordo, já que o aumento da atividade do IKK é capaz de fosforilar o substrato do receptor de insulina (IRS)-1 em resíduo serina, prejudicando assim a via de sinalização por este receptor (14). O aumento dos AGLs, que podem ser provenientes tanto do aumento da lipólise basal decorrente da obesidade, quanto da diminuição da captação de ácidos graxos pelos tecidos periféricos devido à resistência à insulina (15); junto com a elevação das endotoxinas devido a alteração na composição da microbiota intestinal em resposta a dietas ricas em gordura saturada (16); são as possíveis causas da ativação do toll-like receptor 4 (TLR-4), proteína responsável por reconhecer patógenos, principalmente do tipo gram negativos e acionar a resposta imune inata (17) .

Uma vez acionado, o TLR-4 induz uma série de sinalizações que culminam no aumento da expressão de proteínas pró-inflamatórias e na instalação do quadro de resistência à insulina. Outra proteína importante neste processo é o receptor de TNF (TNFR), acionado por TNF- α (Figura 1). Além desses receptores, ativação do

inflamassoma nas células hepáticas também está relacionado com o aumento do quadro inflamatório (18-19), esse complexo multiproteico está relacionado com a ativação da caspase-1, promovendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias na forma ativa, a Interleucina (IL) 1 β e IL-18 (20).

Figura 1 – Via inflamatória. Ativação do TLR-2, TLR-4 e/ou Receptor de fator de necrose tumoral (TNFR) leva a ativação de NF- κ B e JNK e a fosforilação de IRS-1 e IRS-2, inibindo a sinalização da insulina. Além disso, a ativação de IKK β leva a fosforilação e a degradação do inibidor do NF- κ B, I κ B, o que permite a translocação do NF- κ B para o núcleo. Ao mesmo tempo, a ativação da JNK leva a formação do fator de transcrição AP-1. NF- κ B e AP-1 no núcleo ativam a transcrição de genes pró-inflamatórios, o que contribui com o aumento da inflamação e, de uma maneira parácrina, com a resistência à insulina.

O inflamassoma tem relação direta com a disfunção metabólica associada à obesidade, além da caspase-1 e IL-1 β estarem diretamente relacionado com o desenvolvimento da NASH. Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas apresentaram um aumento na expressão gênica de caspase-1 e IL-1 β no fígado, quando comparados com camundongos com dieta normal. Já a deleção da caspase-1 se mostrou de extrema importância no desenvolvimento e manutenção da

esteatose hepática, já que animais nocautes para caspase-1, alimentados com dieta rica em gordura tiveram níveis de lipídeos significativamente menor no fígado, além de apresentarem melhora no metabolismo lipídico circulante observado por níveis menores de colesterol e AGL (18)

Estudos demonstram como principais alvos terapêuticos o exercício físico e a restrição calórica. Trabalhos publicados com pacientes com quadro de NASH mostraram que a perda de peso gradual (5-10%), por restrição calórica e exercício físico regular, levam a uma diminuição na incidência de síndrome metabólica, resistência à insulina, reversão no quadro de esteatose hepática (21-24).

O exercício físico moderado tem uma participação fundamental nesse processo, pois durante sua execução é observado um aumento na concentração sarcoplasmática de Cálcio (Ca^{2+}), devido a contração muscular, e uma alteração na relação AMP/ATP resultante do aumento no consumo de ATP, esses dois mecanismos são responsáveis por ativar a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (25-26).

AMPK é uma proteína heterotrimérica que regula a homeostase energética celular do corpo, coordenando inúmeras vias metabólicas. Quando ativada tem a capacidade de alterar o estado celular de anabólico para catabólico, estimulando o metabolismo oxidativo (27-28).

A ativação da AMPK é importante para a captação de glicose sem estímulo da insulina, por fosforilar o complexo RabGTP, envolvendo as enzimas TBC1D4 e TBC1D1, que permite a dissociação da proteína Rab e a translocação do GLUT-4 para membrana plasmática, aumentando a captação de glicose (27)

Além disso, ela desempenha um papel central na regulação do metabolismo hepático, pois além de estimular a oxidação de AG, reduzindo o conteúdo intracelular de malonil-CoA que por consequência aumenta a expressão da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) (29), parece inibir a síntese *de novo* AG e a produção hepática de glicose (30), estimulando a transcrição de genes mitocondriais e inibindo a expressão de genes lipogênicos. (Figura 2) adaptada de (25)

Figura 2 - AMPK modulada pelo exercício físico e seus mecanismos de ação. A alteração na relação ATP/AMP e a concentração de cálcio aumentada no retículo sarcoplasmático durante o exercício são capazes de ativar AMPK. AMPK diminui a expressão de Malonil-CoA, por consequência aumenta a quantidade de CPT1 e estimula a B-oxidação. AMPK fosforila SIRT1 que estimula a expressão gênica de PGC-1 α e por consequência de PPAR α , e inibe a expressão de genes lipogênicos.

A AMPK pode ser considerada uma enzima com atividade imunometabólica, porque além dos efeitos na modulação do metabolismo de glicose e ácidos graxos nas células é capaz de reduzir a resposta inflamatória por meio da ativação do metabolismo oxidativo, que leva as células imunológicas a expressarem um fenótipo anti-inflamatório, direcionando assim os linfócitos T auxiliares para linfócitos do tipo T *helper*-2, e os macrófagos para um subtipo M2, caracterizados por produzirem IL-4 e IL-10 (28), citocinas essas que inibem a sinalização do NF- κ B, um complexo proteico que atua como fator de transcrição de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β (31)

Alguns estudos relatam que a AMPK aciona a enzima sirtuína-1 (SIRT-1), enzima essa capaz de controlar o processo de deacetilação de diversos fatores e cofatores transcricionais, dentre eles, o PGC-1 α (do inglês “*peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α* ”), ativando, entre outros fatores de transcrição, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARS) (32). Os PPARS são fatores de transcrição da família de receptores nucleares, que controlam a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose e lipídios.

Existem três isoformas de PPAR, sendo que as isoformas α e γ são as mais encontradas no fígado. O PPAR γ , apesar de estimular a transcrição de genes lipogênicos, demonstra um papel importante na redução do quadro inflamatório. Estudos recentes reportam que a ativação do PPAR γ diminui a atividade do fator nuclear κ B (NF- κ B) o que impede a transcrição de proteínas pró-inflamatórias e moléculas quimioatraente, controlando a inflamação além de estar diretamente relacionada com a polarização de macrófagos para o tipo M2, que assumem um caráter anti-inflamatório (33)

Já o PPAR α aumenta o metabolismo oxidativo por estimular a atividade de enzimas da β -oxidação, favorecendo principalmente a β -oxidação peroxissomal, o aumento da proliferação de peroxissomos e a atividade da acil-CoA oxidase (ACO) (34). Na mitocôndria, Os AG de cadeia longa são transportados para a matriz mitocondrial utilizando um co-transporte de carnitina (CPT1, CPT2 e carnitina-acil-carnitina translocase (CACT) (35). Já nos peroxissomos os ácidos graxos de cadeia muito longa são oxidados de maneira dependente da acil-CoA oxidase (ACO) e dessa oxidação não há formação de ATP pela fosforilação oxidativa (34)

Além, de estar envolvido no metabolismo oxidativo, o PPAR α desempenha um importante papel na redução do quadro inflamatório. Isso ocorre, pois ao se ligar no DNA o PPAR α inibi a translocação da subunidade p65 do NF- κ B, o que impede a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Como especificado na figura 3. Rinker e colaboradores(36) verificaram que camundongos PPAR $\alpha^{(-/-)}$ submetidos a dieta hiperlipídica apresentam maior acúmulo de lipídios no fígado, bem como maior infiltrado de macrófagos e expressão de genes pró-inflamatórios.

Figura 3 - Mecanismo de ação do PPARα inibindo NF-κB e aumentando a transcrição de genes do metabolismo oxidativo.

O treinamento físico é capaz de modular a expressão de PPARα no fígado. Três meses de um programa de treinamento físico aumentou de forma significativa a expressão de mRNA de PPARα no fígado de camundongos (37). Esse receptor é essencial na regulação da circulação de triglicerídeos ricos em lipoproteína (TRLs) por aumentar a atividade da Lipoproteína Lipase (LPL), enzima chave na hidrólise do Triacilglicerol (TAG). A LPL também aumenta a concentração de HDL (lipoproteína de alta densidade) e reduz a quantidade de LDL (lipoproteína de baixa densidade), o fenótipo mais prevalente em pacientes com doenças coronarianas (38).

Tendo em vista a importância dos PPARs no metabolismo de ácidos graxos e na redução do quadro inflamatório no fígado, no presente estudo investigamos se o efeito do exercício físico em reduzir o acúmulo de gordura hepático e a inflamação, melhorando o quadro da NAFLD, é dependente de PPARα. E a ação anti-inflamatória do PPARγ no fígado.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Observar se o efeito anti-inflamatório e a redução na NAFLD em animais submetidos ao treinamento físico, alimentados com dieta rica em gorduras saturadas são mediados via PPAR-alpha.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar em camundongos C57BL/6J e PPAR $\alpha^{(-/-)}$ submetidos à dieta hiperlipídica, o efeito do treinamento aeróbio, sobre:

- I. Sensibilidade à insulina (métodos empregados: ITT e GTT)
- II. Alterações no perfil glicêmico, insulinêmico e lipídico plasmático (triglicerídeos, VLDL, LDL e HDL), (métodos empregados: kits colorimétricos para perfil lipídico, glicosímetro para glicemia basal no dia do sacrifício e ensaio imuno-enzimático para insulina)
- III. Grau de esteatose hepática dos animais (histologia por HE)
- IV. A via de sinalização envolvida na resposta inflamatória por alterações no conteúdo de mRNA e proteína total (caspase-1, IL-1 β , TLR4, NLRP3, NF-kB (p65), I κ B-alfa) (PCR real time e Western Blott)
- V. Alterações no conteúdo proteico das enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico (ACC total e fosforilada, AMPK total e fosforilada, FAS total) (Western Blott).
- VI. Ação anti-inflamatória do PPAR γ por expressão das citocinas pró e anti-inflamatórias (ELISA)

3 Justificativa

A obesidade é a doença com maior ascendência na atualidade, tornando-se um problema de saúde pública o que gera altos gastos para o governo anualmente. Esta enfermidade está associada com um quadro inflamatório sistêmico crônico, que pode ser o gatilho para o desenvolvimento da esteatose hepática, uma doença na qual existe um acúmulo de gordura no parênquima fígado e sua complicação pode evoluir para cirrose.

O fígado tem um papel central na homeostase metabólica além de ter um importante papel imunológico, e a injúria desse órgão leva a piora na qualidade e expectativa de vida.

Diversas medidas são tomadas para atenuar os efeitos alarmantes causados pelo quadro inflamatório em indivíduos obesos. Estudos evidenciam que a atividade física é um método eficaz tanto na profilaxia quanto no tratamento desta doença. Durante o exercício a enzima AMPK e o PPAR α são ativados aumentando o metabolismo oxidativo que estimula a oxidação de AG, inibe a síntese *de novo* AG e a produção hepática de glicose; e diminuindo a inflamação sistêmica por meio da inibição do NF-kB.

Deste modo o incentivo a prática regular de exercício físico melhora a qualidade e expectativa de vida da população, auxiliando na gestão de saúde pública, por reduzir os gastos governamentais com medicamentos e tratamentos.

No entanto, são escassos os estudos que tentam demonstrar as vias moleculares associadas às disfunções metabólicas, inflamatórias e ao processo de desenvolvimento da esteatose. O entendimento da associação, entre alterações metabólicas e o processo inflamatório, é extremamente relevante, para a identificação das melhores estratégias para combater a epidemia da obesidade. Podendo a partir daí, selecionar o melhor modelo de treinamento físico, de restrição alimentar e mesmo a utilização farmacológica de agonistas e inibidores das vias que são envolvidas nesse processo.

4 Métodos e atividades de pesquisa desenvolvidas

4.1 Protocolo experimental

4.1.1 Desenhos experimentais e Administração das dietas

Foram utilizados camundongos *knockout* para PPAR α (KO) e a linhagem *background* C57BL/6J (WT) obtidos da Jackson Laboratory mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12h e temperatura de 23 ± 2 °C, com dieta normal (ração Nuvital da Nuvilab, Colombo, PR) e água *ad libitum*. Para o desenho experimental 1 (E1) usamos animais machos, entre 10-12 semanas de idade, que foram alimentados com dieta de baixo teor de gordura (SD, 9% de calorias de gordura, 15% de calorias de proteína e 76% de calorias de carboidratos) ou dieta rica em gordura (HF, 59% de calorias de gordura, 15% de calorias de proteína e 26% de calorias de carboidratos), durante 12 semanas. Para o desenho experimental 2 (E2) utilizamos apenas os animais KO alimentados com dieta HF.

No E1, a partir da quinta semana de dieta metade dos animais alimentados com dieta hiperlipídica foram submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio crônico (T), que se estendeu até a última semana do protocolo experimental. Enquanto os outros animais continuaram sedentários. Como observado na figura 4.

Figura 4 - Desenho experimental 1. Divisão dos grupos dos animais selvagens (WT) ou knockout para PPARα (KO) alimentados com a dieta balanceada (SD) ou high fat (HF) e submetidos ao treinamento aeróbio (HFT).

No E2 os animais foram submetidos ao treinamento aeróbio durante as 8 semanas finais da administração da dieta e receberam uma dose diária de Rosiglitazona via oral (Figura 5)

Figura 5 - Desenho experimental 2. Divisão dos grupos dos animais knockout para PPARα (KO) alimentados com a dieta hiperlipídica (HF) que foram submetidos ao treinamento aeróbio (HFT) e receberam Rosiglitazona (HFT RG).

As respectivas composições dietéticas utilizadas estão descritas na AIN-93 ou foram adaptadas de Ropelli (39), tais composições são indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dietética das dietas com baixo teor de gordura (SD) ou rica em gordura (HF)

Ingredientes	SD	HF
L-Cistina (gr/kg)	1,8	3
Bitartarato de colina (gr/kg)	2,5	2,5
Mix de vitaminas (gr/kg)	10	10
Mix de minerais (gr/kg)	35	35
Celulose microfina (gr/kg)	50	50
Sacarose (gr/kg)	100	100
Caseína (gr/kg)	140	200
Amido dextrinizado (gr/kg)	155	132
Amido de milho (gr/kg)	465,7	115,5
Óleo de soja (gr/kg)	4	35
Banha de suínos (gr/kg)	36	315
Água (ml)	400	0

4.1.2 Treinamento Aeróbio crônico

Os animais do grupo treinado, E1 e E2, foram submetidos ao treinamento aeróbio durante as 8 semanas restantes do protocolo experimental. Este treinamento consistiu em 5 seções por semana de 40 a 60 minutos cada (40) nas quais os animais corriam em uma velocidade correspondente a 60% da velocidade máxima estimada, obtida a partir do teste de exaustão.

4.1.3 Teste de exaustão

Para determinação da Velocidade máxima realizamos um teste de exaustão no qual os animais aqueceram durante 5 minutos na velocidade de 10 metros/minuto (m/m) após o sexto minuto a velocidade da esteira foi aumentada em 3 m/m a cada minuto até que os animais chegassem a exaustão, esta foi caracterizada por alterações biomecânicas na corrida do animal. Este teste foi realizado antes do início do protocolo de treinamento, na quinta semana do protocolo experimental, para determinação da carga de trabalho; na oitava semana de tratamento para ajuste da carga de trabalho e na 12ª semana de tratamento para verificar se houve uma melhora do desempenho em resposta ao treinamento aeróbio crônico.

4.1.4 Administração da Rosiglitazona

Metade dos animais do E2 receberam uma administração diária de 15 mg/kg de Rosiglitazona durante todo período de treinamento. A Rosiglitazona foi proveniente do medicamento Avandia®, o qual foi misturado a ração dos animais.

4.1.5 Peso e composição corporal, ingestão alimentar e peso dos órgãos

Durante o período de alimentação/tratamento, o peso e a ingestão alimentar de E1 e E2 Foram mensurados uma vez e três vezes na semana respectivamente. Após as 12 semanas, os animais foram submetidos a 6 horas de jejum antes de serem sacrificados para a coleta de amostras de sangue e de tecidos. Foram cuidadosamente retirados os músculos gastrocnêmio e sóleo, o tecido adiposo marrom, o fígado, bem como os tecidos adiposos epididimal (TAEP), retroperitoneal (TARP) e subcutâneo (TASC) e, após os procedimentos de dissecação os tecidos e

órgãos foram lavados em tampão Salino-Fosfato (PBS, pH 7,4) e pesados, sendo posteriormente mantidos a -80 °C (fígado, gastrocnêmio e TARP). A soma dos diferentes depósitos de tecido adiposo branco foi utilizada para determinar o índice de adiposidade. Todos os procedimentos desse estudo seguiram os princípios éticos de experimentação animal e foram aprovados 11 de outubro de 2013 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo protocolo registrado sob nº 112 na folha 11 do livro 3.

4.1.6 Procedimentos analíticos

Como descrito anteriormente, após as 12 semanas do protocolo experimental (dieta e treinamento) os animais foram eutanasiados e amostras de sangue e tecidos foram coletadas. Para isso, os animais foram previamente anestesiados em câmara de CO₂ e posteriormente eutanasiados por decapitação. O sangue coletado em tubos plásticos foi centrifugado (3000 rpm, 12 min, 4 °C) para a extração do soro. As concentrações de colesterol total, Triacilglicerol, atividade da aspartato transaminase (AST) e glicemia basal no soro, foram determinadas por kits enzimáticos de acordo com instruções dos fabricantes (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil, ref. 76, 87, 138 e 133 respectivamente). Os níveis de ácido graxo livre foram determinados por ensaio enzimático colorimétrico de acordo com as instruções dos fabricantes (Wako - HR Series NEFA-HR cod.999-34691). A concentração plasmática de insulina foi analisada por ensaio imunoenzimático de acordo com o fabricante (MILLIPORE).

4.1.7 Histologia do fígado.

Uma porção de 5 mm de fígado foi imediatamente imersa em solução de PBS Contendo paraformaldeído (4% (p/v), pH 7,4, 4 °C) durante 24 horas. Após este período, as fatias foram lavadas várias vezes em etanol 70% e armazenadas em álcool 70%. Posteriormente, as fatias foram submetidas a sucessivos banhos em etanol 70%, 90%, 95%, até o etanol absoluto, com intervalos de 30 minutos entre cada banho, seguido por um banho em mistura homogênea de etanol e xilol por 30 minutos e três banhos de xilol com duração de 20 minutos cada. Por fim, as fatias foram impregnadas em paraplastPlus® (Sigma, São Paulo, SP, Brasil) (58 °C, por 3 horas)

e foram emblocadas em Tissue Cassetes (Fisher Scientific, São Paulo, SP, Brasil). Os blocos foram submetidos à microtomia, com cortes consecutivos de 5,0 µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas previamente cobertas com poli lisina (Sigma, São Paulo, SP, Brasil). As lâminas com os cortes histológicos foram desparafinizadas com xilol, hidratadas em banhos decrescentes de etanol (100 a 70%) e água destilada, coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas em água corrente, e coradas com eosina durante 1 minuto. A análise da morfologia das células foi realizada utilizando imagens digitalizadas com aumento de 40x. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio óptico modelo ICS Standard 25 (CarZeiss, Brasil) com câmera acoplada modelo AxioCam HRC (CarZeiss, Brasil). Para cada corte histológico foram capturadas 4 imagens coradas com H&E.

4.1.8 Dosagem dos níveis de Triacilglicerol no fígado

Os lipídios foram extraídos do fígado com clorofórmio-metanol, como descrito por Folch (41). Os níveis de Triacilglicerol foram dosados por um ensaio enzimático (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil ref. 87), do tipo *end point*, e a absorbância foi medida no espectrofotômetro.

4.1.9 Avaliações da responsividade à insulina

4.1.9.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Para a construção da curva glicêmica, os animais em jejum prévio de 6 horas receberam uma dose de glicose (2 g/kg peso corporal) intraperitoneal. Realizou-se a determinação da glicemia capilar caudal, através de glicosímetro *Accu-Chek Active®* 12 (ROCHE®, São Paulo, SP, Brasil) em diferentes momentos: 0 (basal), 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de glicose. Este teste foi realizado na 4ª, 8ª e 11ª semana do procedimento experimental.

4.1.9.2 Teste de tolerância à insulina (ITT)

O teste de tolerância à insulina foi realizado na última semana do protocolo experimental e avaliado conforme descrito previamente por (42). A glicemia capilar caudal foi monitorada por meio do glicosímetro *Accu-Chek Active®* (ROCHE®, São Paulo, SP, Brazil), sendo mensurada na condição basal e a cada 10 min após injeção intraperitoneal de insulina (0,5 UI/kg de peso corpóreo) até 40 min. A constante de desaparecimento da glicose no plasma (kITT) foi calculada a partir da regressão linear dos valores da glicemia obtidos entre 10 a 30 minutos após a injeção de insulina, intervalo onde ocorre a fase linear de queda da glicemia(43-44). A interpretação da kITT se baseia em quanto mais rápida e intensa for a queda da glicemia, maior o valor do kITT, portanto, maior é a resposta a insulina.

4.1.10 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Amostras de tecido do fígado (80-100 mg) foram cuidadosamente homogeneizados em tampão de extração (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM de NaCl e 1 mM de ortovanadato de sódio) contendo 10 ug / ml de inibidor de protease cocktail (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA). As amostras foram centrifugadas a 14.000r.p.m., a 4 °C, por 30 minutos e os sobrenadantes submetidos à quantificação proteica pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad®, Hercules, CA, EUA), e em seguida, utilizados para determinar os níveis proteicos de IL-1 β , IL-8, IL-12, IL-6, IL-10 e TNF- α por ELISA (DuoSet ELISA®, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA. Catalogo nº SMOB00). Para IL-1 β , IL-6, IL- 8, IL-10, IL-12 e TNF- α , a sensibilidade do ensaio foi de 5,0 mg/ml para um intervalo de 31,2 a 2000 pg/ml.

4.1.11 PCR-tempo real

A expressão genica dos genes hepáticos relacionados com a síntese e a oxidação de ácidos graxos (ACC, FAS, SREBP-1, PPAR γ e AMPK) e com a via do inflamassoma (TLR4, capase-1, NLRP-3 e NF-kB) foram analisados por PCR-tempo real com Syber Green. Para tal, foi extraído RNA total como descrito por

Chomczynski and Sacchi (1987) (45), quantificado no espectrômetro (260 nm/ 280 nm), e gerado cDNA utilizando a transcriptase reversa. A sequência de primers utilizados está descrita na tabela 2. A expressão genica foi quantificada pelo método comparativo descrito por Livak, 2001 (46), utilizando a expressão de RPL-19 como controle endógeno.

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na análise do PCR-tempo real.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
RPL-19	CAATGCCAACTCCCGTCA	GTGTTTTTCCGGCAACGA
ACC	CCAGCAGATTGCCAACATC	ACTTCGGTACCTCTGCACCA
FAS	GATTCGGTGTATCCTGCT	CATGCTTTAGCACCTGCT
SEREBP-1	AGTCCTTGACCAACGTA	GACTTCCAGTTGGTACG
AMPK	AGCCGACTTTGGTCTTTC	GCCTGCGTACAATCTTCC
NRLP-3	TCCTGCAGAGCCTACAGTT	GCCTACCAGGAAATCTCGAA
TLR-4	TCCAGCCACTGAAGTTCT	CAGCAAAGTCCCTGATGA
NFkB	CCAACTGGCAGGTATTTGAC	GCTGCTTCATGTCCCCTT
PPAR γ	ATCTTAACTGCCGGATCC	CAAACCTGATGGCATTGTG
SCD1	TCCAGAATGACGTTACGATG	CACGTGAGAGAAGAAGAAGC
F4/80	GAATCCTGTGAAGATGTGGATG	GGCATGAGCAGCTGTAGGA
CD86	GTACCTGCTAAGGATCCGAC	CCTAAGCGATCCGTTGCAG
Myd88	TCCAGGTGTCCAACAGAAG	ACTTGGTGCAAGGGTTGCT

4.1.12 Western blotting

Amostras do Fígado foram cuidadosamente homogeneizadas em buffer de extração de proteínas contendo proteases e inibidores de fosfatase. Após passarem por um processo de centrifugação, a quantidade de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA). Alíquotas de 25 gramas de proteína de cada amostra foram diluídas em Laemmli buffer. As amostras foram então submetidas a eletroforese no gel de SDS-policrilamida (SDS-PAGE), após este

processo elas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com molico a 5%, depois encubada overnight com anticorpo primário referente a proteína alvo de estudo, e por fim encubada com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase. Após este processo as membranas foram encubadas com substrato de peroxidase (ECL kit, Biorad®, USA) e quantificadas por densitometria ótica.

4.2 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média (DPM) e analisados pela análise de variância de duas vias (*Anova Two-Way*) ou de uma via (*Anova oneway*), seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando-se o programa GRAPHPAD PRISM 5.0 e os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

5 Resultados

5.1 Efeitos do treinamento Aeróbio crônico sobre o peso corporal e o peso dos tecidos dos animais

A alimentação com uma dieta HF foi capaz de aumentar o peso dos animais WT cuja diferença pode ser observada a partir da quarta semana de tratamento comparando com animais alimentados com dieta balanceada (Figura 6 A); enquanto nos camundongos KO essa diferença só pode ser observada na 12ª semana.

Assim como um aumento de peso corporal, a dieta HF também está relacionada a um ganho de tecido adiposo branco retroperitoneal, epidídimal e subcutâneo, bem como um aumento no índice de adiposidade para os animais WT (Figura 7 A - D), esta diferença foi também observada para os animais KO, porem estes apresentam um índice de adiposidade bem reduzido comparado com os selvagens. O tecido adiposo marrom foi menor nos animais HF e HFT KO comparados

com seus respectivos WT (Figura 7 E). O treinamento reduziu o peso corporal para ambos os genótipos e o índice de adiposidade nos WT.

Figura 6 - Ganho de peso corporal dos Camundongos WT e KO submetidos à dieta padrão (SD) ou à dieta rica em gordura (HF) ao longo do tempo (A), diferença do ganho de peso corporal entre os animais HF e HFT KO(B) e WT (C). Os dados são apresentados como média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. respectivos grupos SD, HF e HFT (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 7 - Peso do tecido adiposo (T.A.) Retroperitoneal (A), subcutâneo (B), epididimal (C), respectivo índice de adiposidade (D) e marrom (E), de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF), submetidos ao treinamento aeróbio crônico (HFT), a linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001; ###p<0,001 em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

5.2 Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre o perfil lipídico, no soro

Os animais alimentados com HF apresentaram uma hipercolesterolemia que foi revertida pelo treinamento crônico apenas nos animais WT (Figura 8 A), sugerindo uma participação importante do PPAR α neste processo.

Observamos também um aumento nos valores de TAG e AGL nos animais KO quanto treinados (HFT KO) (Figura 8 B e C) comportamento não observado nos camundongos WT.

Figura 8 - Colesterol total (A), Triacilglicerol (B) e ácido graxo livre (C) no soro de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF), submetidos ao treinamento aeróbio crônico (HFT), a linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

5.3 Efeito do treinamento aeróbio crônico sobre o perfil glicêmico e a resposta à insulina

Nossos resultados mostraram que a glicemia basal foi aumentada para os animais HF WT e diminuída no grupo HFT WT, os KO apresentaram glicemia diminuída em comparação com WT (Figura 9 A). Não observamos diferença nos níveis de insulina no soro (Figura 9 B), entretanto os animais submetidos a HF apresentaram uma resposta à insulina reduzida no ITT. Dados estes que podem ser comprovados pelo kITT diminuído, o que representa que houve um menor decaimento da glicemia após a administração de insulina nestes animais (Figura 11), além disso observamos que os animais KO apresentam um quadro de resistência à insulina já instaurado, pois mesmo quando alimentados com dieta padrão esses animais mostram-se resistentes.

No GTT a dieta HF provocou maior aumento da glicemia basal, mantendo esses valores mais elevados até o final do teste (Figura 10). Estes dados podem ser comprovados pela área sob a curva (AUC) aumentada nas duas linhagens de animais. Os camundongos KO apresentaram glicemia mais baixa em ambos os momentos.

Os animais treinados apresentaram uma concentração de glicose reduzida em ambos os GTTs, bem como uma melhora na resposta periférica à insulina tendo um KITT aumentado. Tais efeitos puderam ser observados apenas nos animais WT.

Figura 9 - Glicemia basal (A), Insulina (B), no soro de camundongos WT e KO submetidos à dieta padrão (SD) ou à dieta rica em gordura (HF), e treinados durante 8 semanas (HFT). Os dados são média $\pm$ SEM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 10 - Curva glicêmica após a administração de glicose em animais WT (A) ou KO (B), e as respectivas AUCs (C). De camundongos WT e KO submetidos à dieta padrão (SD) ou à dieta rica em

gordura (HF), e treinados durante 8 semanas (HFT) na 11ª semana no protocolo experimental. Os dados são média $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 11 - Curva de decaimento da glicose após a administração de insulina (kITT) de camundongos WT e KO submetidos à dieta padrão (SD) ou à dieta rica em gordura (HF), e treinados durante 8 semanas (HFT) na 12ª semana no protocolo experimental. Os dados são média $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

5.4 Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre parâmetros da esteatose hepática

Com base nos resultados anteriores fomos investigar o acúmulo de gordura no fígado, dos animais alimentados com a dieta HF, e se o treinamento pode reverter este processo. Nossos resultados mostraram que os animais selvagens treinados, alimentados com HF, exibiram drástica redução no conteúdo de TAG hepático (Figura 12 A), bem como uma estrutura do fígado preservada, sem o desenvolvimento da NAFLD, como revelado nas análises histológicas (Figura 13). Os animais KO também apresentaram redução no acúmulo de gordura no fígado, entretanto apresentam valores mais elevados de TAG em comparação com WT. Os níveis de aspartato aminotransferase (AST), importante marcador plasmático de dano hepático, foi reduzido pelo treinamento apenas nos animais HFT WT (Figura 12 B)

Verificamos também que a dieta HF aumentou o peso do fígado de ambos os genótipos (Figura 12 C), porém o treinamento foi eficiente na redução desse valor apenas nos animais KO.

Figura 12 - Concentração de triglicérides extraídos do fígado (A), Aspartato transaminase (AST) no soro (B) e peso do fígado (C) de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF), submetidos ao treinamento aeróbio crônico (HFT), a linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 13 - Cortes histológicos de fígado corados por hematoxilina e eosina (HE), aumento médio (20X). Histologia do fígado de animais WT e PPAR α knockout (KO) submetidos à dieta padrão (SD) ou à dieta rica em gordura (HFD). Os animais foram submetidos ao treinamento aeróbio (Treinado) ou permaneceram sedentários (Sedentário) durante as 8 semanas finais do protocolo experimental.

5.5 Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre as vias do metabolismo de ácidos graxos no fígado

Com base nos resultados do acúmulo de lipídios no fígado, nós avaliamos por expressão gênica e proteica a via da lipogênese de novo e da oxidação de ácidos graxos no fígado. Nossos primeiros resultados mostraram aumento na expressão gênica de FAS e SREBP1 para os animais HF WT e o treinamento não foi capaz de reduzir esses valores (Figura 13 A e B). De maneira interessante os animais selvagens treinados mostraram aumento na expressão gênica de ACC (Figura 14 C) e os camundongos KO apresentaram redução em todos esses parâmetros. Entretanto quando nós avaliamos a fosforilação da ACC na serina 79, verificamos que os animais HFT WT apresentam uma fosforilação aumentada, indicando inativação dessa proteína, enquanto os animais HFT KO mantêm esse valor reduzido (Figura 15).

Ao contrário do esperado os animais treinados de ambos os genótipos apresentaram redução na expressão gênica de AMPK e CPT-1 (Figura 16), enzimas chaves do metabolismo oxidativo. No entanto, os camundongos HFT WT mostram uma tendência em aumentar a fosforilação da AMPK na tirosina 172, indicando maior ativação dessa proteína (Figura 17).

Figura 14 - Expressão gênica de FAS (A), SREBP1 (B) e ACC (C), relativizado pelo RPL-19, no Fígado de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF), submetidos ao treinamento aeróbio crônico (HFT), a linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 15 - Expressão proteica da ACC fosforilada em serina 79, relativizada pela ACC total, no Fígado de camundongos WT e KO submetidos à dieta padrão (SD) ou à dieta rica em gordura (HF), e treinados durante 8 semanas (HFT). A linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 16 - Expressão gênica de FAS (A), SREBP1 (B) e ACC (C), relativizado pelo RPL-19, no Fígado de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF), submetidos ao treinamento aeróbio crônico (HFT), a linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 17 - Expressão proteica da AMPK fosforilada em tirosina 172, relativizada pelo GAPDH, no Fígado de camundongos WT e KO submetidos à dieta padrão (SD) ou à dieta rica em gordura (HF), e treinados durante 8 semanas (HFT). A linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

5.6 Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre a inflamação hepática

Devido a correlação existente entre a inflamação e o desenvolvimento da esteatose hepática, nós decidimos avaliar a expressão dos genes envolvidos na via do inflamassoma e o conteúdo proteico das citocinas pró e anti-inflamatórias no fígado. Nossos resultados foram controversos, uma vez que a expressão gênica da via inflamatória foi aumentada para os animais HF e diminuída quando esses animais foram treinados (Figura 18). Entretanto, não houve aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-12 e TNF- α em nenhuma linhagem (Figura 19); porém os camundongos KO, quando alimentados com dieta HF e expostos ao treinamento crônico, apresentaram aumento significativo dessas citocinas.

Quando avaliamos as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4, verificamos aumento desses valores para ambos genótipos e diminuição na IL-1Ra para HFT WT (Figura 20).

Figura 18 - Expressão gênica de NLRP-3 (A), Caspase-1 (B), NF-κB (C), TLR-4 (D) e IL-1β (E) relativizado pelo RPL-19, no Fígado de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF), submetidos ao treinamento aeróbico crônico (HFT), a linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$; ### $p<0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 19 - Níveis de IL- β (A), IL-6 (B), IL-8 (C), IL-12 (D) e TNF- α (E) e MCP-1 (F) no Fígado de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF), submetidos ao treinamento aeróbio crônico (HFT), a linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 20 - Níveis de IL-4 (A), IL-10 (B) e IL-1Ra (C) no Fígado de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF), submetidos ao treinamento aeróbio crônico (HFT), a linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

5.7 Efeitos do treinamento aeróbio crônico sobre a expressão de PPAR γ no fígado.

Tendo em vista o resultado interessante de inflamação hepática nos animais HFT KO, nós fomos investigar a expressão de PPAR γ no fígado desses camundongos e verificamos que grupo HF KO apresentou uma superexpressão proteica e gênica desse receptor nuclear, e que quando expostos ao treinamento, esses valores reduziram drasticamente (Figura 21).

Figura 21 - Expressão gênica (A) e proteica (B e C) de PPAR γ , no Fígado de camundongos WT e KO submetidos à dieta padrão (SD) ou à dieta rica em gordura (HF), e treinados durante 8 semanas (HFT). A linha tracejada representa os animais controles alimentados com dieta balanceada. Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ### $p < 0,001$ em comparação com controle (Two-way ANOVA seguido por Bonferroni).

5.8 Efeitos da administração de rosiglitazona sobre o peso corporal e o peso dos tecidos dos animais KO

Devido aos resultados de inflamação hepática seguida pela diminuição da expressão de PPAR γ no fígado dos animais KO treinados, nós decidimos tratar esses animais com rosiglitazona durante o período de treinamento. Nossos primeiros resultados do E2 mostraram que a administração de rosiglitazona manteve o peso dos animais treinados mais baixo em comparação com HF KO (Figura 22); e promoveu um remodelamento do tecido adiposo branco diminuindo o depósito retroperitoneal e aumentando de forma significativa o depósito subcutâneo e epididimal, sem alterar o índice de adiposidade (Figura 23 A-D). Os animais HFT RG KO também apresentaram um aumento significativo no peso do tecido adiposo marrom (Figura 23 E).

Figura 22 - Peso dos camundongos KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF KO) e submetidos ao treinamento aeróbico crônico (HFT KO) ou submetidos ao treinamento crônico e tratados com rosiglitazona (HFT RG KO). Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 23 - Peso do tecido adiposo (T.A.) Retroperitoneal (A), subcutâneo (B), epididimal (C), respectivo índice de adiposidade (D) e marrom (E), de camundongos KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF KO) e submetidos ao treinamento aeróbico crônico (HFT KO) ou submetidos ao treinamento crônico e tratados com rosiglitazona (HFT RG KO). Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido por Bonferroni).

5.9 Efeitos da administração de rosiglitazona sobre o perfil glicêmico e lipídico no soro e sobre a resposta periférica à insulina dos animais KO

Os Animais HFT KO apresentaram um aumento na glicemia basal em comparação com o grupo HF KO, e a administração com rosiglitazona tende a reverter esse aumento (Figura 24 A). Não conseguimos observar diferença nos valores de colesterol total entre os grupos, entretanto houve uma redução de TAG e uma brusca queda de AGL nos animais treinados que receberam rosiglitazona (HFT RG KO) (Figura 24 B-D).

Na 11^a e 12^a semana de dieta nós realizamos o teste de GTT e ITT, respectivamente, para avaliar a resposta a insulina desses animais. Nossos resultados mostraram que os animais que receberam Rosiglitazona tiveram um decaimento maior da glicemia após a aplicação da glicose (Figura 25 A), apresentando uma área sobre a curva reduzida (Figura 25 B). Esses animais também apresentaram uma maior sensibilidade à insulina por exibir aumento no kITT (Figura 25 C).

Figura 24 – Níveis de glicemia basal (A), colesterol total (B), Triacilglicerol (C) e ácido graxo livre (D) no soro de camundongos KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF KO) e submetidos ao treinamento aeróbico crônico (HFT KO) ou submetidos ao treinamento crônico e tratados com rosiglitazona (HFT RG)

KO), Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 25 – Curva glicêmica após a administração de glicose (A), respectiva área sob a curva (B) e constante de decaimento da glicose após administração de insulina (KITT) (C) em camundongos KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF KO) e submetidos ao treinamento aeróbico crônico (HFT KO) ou submetidos ao treinamento crônico e tratados com rosiglitazona (HFT RG KO). Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido por Bonferroni).

5.10 Efeitos da administração de rosiglitazona sobre a inflamação hepática dos animais KO

Depois de caracterizar os animais tratados com rosiglitazona quanto ao peso corporal, peso dos tecidos e responsividade a insulina, nós fomos analisar os parâmetros inflamatórios no fígado. A expressão proteica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e MCP-1 foi drasticamente reduzida no nos camundongos que receberam rosiglitazona durante o treinamento (HFT RG KO) em comparação com os que não receberam (HFT KO) (Figura 26). Quanto a expressão gênica, o grupo HFT RG KO apresentou uma redução significativa de NF- κ B e IL-1 β ; e um aumento de TLR-4 e Myd88 (Figura 27).

Figura 26 - Níveis de IL- β (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e MCP-1 (D) no Fígado de camundongos KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF KO) e submetidos ao treinamento aeróbico crônico (HFT KO) ou submetidos ao treinamento crônico e tratados com rosiglitazona (HFT RG KO), Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 27 – expressão gênica de NF-κB (A), IL-β (B), TLR-4 (C) e Myd88 (D) no Fígado de camundongos KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF KO) e submetidos ao treinamento aeróbico crônico (HFT KO) ou submetidos ao treinamento crônico e tratados com rosiglitazona (HFT RG KO), Os dados são média ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido por Bonferroni).

5.11 Efeitos da administração de rosiglitazona sobre a expressão de PPARγ e seus genes alvos.

Devido a rosiglitazona ser um importante agonista de PPARγ e aos resultados positivos de inflamação hepática que obtivemos no grupo HFT RG KO, nós analisamos a expressão genica de PPARγ e seus genes alvos no fígado dos camundongos. Ao contrário do esperado nós não observamos aumento de mRNA de PPARγ nos animais tratados com Rosiglitazona (Figura 28 A), entretanto notamos aumento na expressão de PGC-1α e FAS (Figura 28 B e C) e diminuição de CPT-1 (Figura 29 A). O treinamento diminuiu a quantidade de mRNA de SCD-1 e SREBP-1 (Figura 29 B e C), e os animais tratados com rosiglitazona tiveram uma tendência a reverter essa queda. Este grupo também apresentou redução na expressão de F4/80 e CD86 (Figura 30).

Figura 28 – expressão gênica de PPAR γ (A), PGC-1 α (B) e FAS (C) no Fígado de camundongos KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF KO) e submetidos ao treinamento aeróbio crônico (HFT KO) ou submetidos ao treinamento crônico e tratados com rosiglitazona (HFT RG KO). Os dados são média $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 29 – expressão gênica de CPT-1 (A), SCD-1 (B) e SREBP-1 (C) no Fígado de camundongos KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF KO) e submetidos ao treinamento aeróbico crônico (HFT KO) ou submetidos ao treinamento crônico e tratados com rosiglitazona (HFT RG KO), Os dados são média $\pm$ SD. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ (One-way ANOVA seguido por Bonferroni).

Figura 30 – Expressão gênica de F4/80 (A) e CD86 (B) no Fígado de camundongos KO alimentados com dieta hiperlipídica (HF KO) e submetidos ao treinamento aeróbico crônico (HFT KO) ou submetidos ao treinamento crônico e tratados com rosiglitazona (HFT RG KO), Os dados são média $\pm$ SD. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ (One-way ANOVA seguido por Bonferroni).

6 Discussão

No presente estudo, o exercício aeróbio crônico mostrou-se eficiente em diminuir o acúmulo de gordura nos hepatócitos em um modelo experimental de NAFLD, caracterizado pela deleção do receptor nuclear PPAR α (animais PPAR α knockout), bem como em animais selvagens, submetidos a uma dieta hiperlipídica por um período de 12 semanas. Nosso protocolo de treinamento aeróbio moderado na esteira foi capaz de reduzir ganho de peso corporal e o índice de adiposidade em ambos os genótipos, e resistência periférica à insulina nos camundongos selvagens. Juntos, esses resultados sugerem que o treinamento aeróbio crônico exerce os efeitos benéficos em reduzir a NAFLD, o ganho de peso corporal e o índice de adiposidade por mecanismos que não necessitam do PPAR α . No nosso modelo de obesidade nós não encontramos a associação entre inflamação hepática e o desenvolvimento da NAFLD, entretanto, ao contrário do esperado, o treinamento aeróbio aumentou de forma significativa a inflamação hepática nos animais KO. Este aumento da inflamação hepática pode ser entendido por uma diminuição da expressão proteica de PPAR- γ , o que gerou um possível aumento do processo inflamatório, tanto que quanto os animais foram submetidos ao tratamento com agonista de PPAR- γ , essa inflamação hepática foi revertida.

Como já esperado, os animais alimentados com dieta HF aumentaram o peso em comparação com os animais controle, porém os animais KO têm um aumento de peso mais tardio comparado com os WT. Esses resultados vão ao encontro de resultados que encontramos na literatura que demonstram que animais que não expressam PPAR α apresentam uma importante resistência ao ganho de peso (47-48). Assim como, o aumento de peso corporal, a dieta rica em gordura saturada também está relacionada a um ganho de tecido adiposo branco retroperitoneal, epididimal e subcutâneo, bem como um aumento no índice de adiposidade para os animais WT (Figura 2), esta diferença foi também observada para os animais KO, porém estes apresentam um índice de adiposidade bem reduzido comparado com os selvagens.

Como já fortemente evidenciado na literatura o treinamento aeróbio foi eficiente na redução do ganho de peso corporal nas duas linhagens de camundongos, a partir da segunda semana de treinamento, sexta semana do protocolo experimental, já conseguimos observar um ganho de peso menor dos animais treinados, no entanto,

apenas os selvagens apresentaram redução no índice de adiposidade, visto que os KO já possuem esse valor reduzido. O treinamento aeróbio é um mecanismo eficiente, no auxílio ao combate da obesidade e da diminuição das co-morbidades associadas a essa patologia, sendo eficaz em diminuir a quantidade de gordura corporal (49-51). Além do auxílio na perda de peso, o treinamento aeróbio crônico foi eficiente em diminuir a intolerância à glicose e a intolerância à insulina nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. Todos esses efeitos positivos do treinamento aeróbio sobre o quadro de hiperglicemia, resistência à insulina e intolerância à glicose já são bem descritos na literatura (52-55), já que o treinamento aeróbio prolongado atua de forma positiva na melhora do quadro de resistência periférica a insulina (56-58) e auxilia na captação de glicose por meio da translocação de GLUT-4 (59-60).

Os grupos de animais KO apresentaram uma glicemia basal mais baixa assim como, uma menor intolerância à glicose, comparado com os grupos WT, independente do treinamento. A deleção de PPAR-alfa impede a hiperglicemia em camundongos tratados com HF (47, 61-62); (63). O mecanismo para isso não parece ser alteração na função de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas (47), mas sim uma diminuição na capacidade gliconeogênica hepática (64); (65)

O grupo HF apresentou hipercolesterolemia independente do genótipo dos grupos. No entanto, o treinamento aeróbio foi eficaz em reverter o aumento encontrado em animais HF selvagem. Já quanto ao conteúdo plasmático de TAG, só os animais HFT KO apresentaram elevação. Este efeito que parece ser contraditório pode ser explicado pelas profundas alterações no metabolismo lipídico hepático, quando animais PPAR alpha KO são submetidos a condições de estresse, como o jejum prolongado(66).Em nosso modelo experimental, a alteração do TAG plasmático pode estar associada a sobreposição de fatores estressores, como a sobrecarga de gordura, induzida pela dieta HF, e pelo treinamento físico aeróbio.

Além da dislipidemia plasmática provocada pelo consumo em dieta rica em gordura, há evidências profundas do aumento do acúmulo de lipídeos hepáticos nos animais que consomem esse tipo de dieta e que se mantêm sedentários, promovendo assim a instalação do quadro de NAFLD (67-70).

A progressão do quadro da NAFLD leva a cirrose, e em último grau ao carcinoma hepático. Neste estudo, observamos essas condições em ambos os genótipos e 8 semanas de treinamento aeróbio foi capaz de reverter o acúmulo de

lipídios nos hepatócitos, assim como diminuir o peso do fígado e os danos hepáticos. Em concordância com os nossos achados, Gonçalves e colaboradores (2014) (71) mostraram que o treinamento aeróbio regular foi eficiente em recuperar as funções mitocondriais e diminuir o acúmulo de lipídios no fígado de camundongos, em um modelo experimental de NASH.

Observamos ainda que os animais PPAR α KO desenvolveram uma esteatose hepática severa e quando foram submetidos ao protocolo de treinamento tiveram esse quadro revertido. O PPAR α é fundamental na regulação da β -oxidação no fígado, já que este é um fator nuclear que regula a expressão de genes alvos do metabolismo oxidativo hepático. O PPAR α ativa a CPT-1, enzima chave no processo de transporte de acil-CoA, proveniente do início do processo da beta-oxidação para a membrana interna da mitocôndria, permitindo assim a oxidação total de lipídios. A deficiência de PPAR α leva a uma profunda diminuição da expressão de CPT-1, o que provoca em última instância um aumento de lipídios hepáticos na forma de triglicerídeos (72) (73). Em nosso protocolo o treinamento aeróbio crônico não foi capaz de modular positivamente a expressão gênica de CPT-1.

Sustentando a hipótese de que os animais KO treinados não aumentam a oxidação hepática de lipídios, nossos resultados mostraram uma queda na expressão genica da AMPK, outra importante enzima oxidativa no fígado em ambos os genótipos. AMPK é uma enzima chave que estimula a oxidação de AG por aumentar a expressão de CPT-1, além disso, inibe a lipogênese *de novo* e a produção hepática de glicose por estimular a transcrição de genes mitocondriais e inibir a expressão de genes lipogênicos (25, 29-30). Nós também observamos uma redução na fosforilação AMPK em tirosina 172 nos animais HFT KO e uma tendência em recuperar esses níveis nos animais HFT WT. A AMPK é uma enzima modulada por estímulos agudos, uma vez que é um importante sensor da razão AMP/ATP, nossos camundongos foram sacrificados 72 horas após a última sessão de treino, talvez por isso não conseguimos observar um aumento efetivo na fosforilação da AMPK nos animais selvagens. Corroborando com nossos dados, Piguet e colaboradores (2015) (74) encontraram um aumento na fosforilação de AMPK nos animais sacrificados imediatamente após uma sessão de treino e não conseguiram observar o mesmo comportamento quando sacrificaram os camundongos 72h após o exercício moderado.

Com isso, nós acreditamos que o efeito do exercício em reduzir o acúmulo de lipídio no fígado nos animais KO não seja devido a um aumento na oxidação hepática

e sim por um aumento na oxidação de ácidos graxos pelo musculo esquelético, uma vez que, durante o exercício aeróbio moderado o musculo utiliza ácidos graxos como fonte de energia (75-76), diminuindo a oferta de lipídios para o fígado. Apoiando nossa hipótese, um estudo recente mostrou que o PPAR α inibe a expressão da isoforma da cadeia pesada de miosina 1 (MHC-1), presente nas fibras oxidativas do tipo-1, fazendo com que os animais PPAR α knockout a tenham um aumento de fibras do tipo-1, permitindo maior oxidação de ácidos graxos durante o exercício (77).

Não obstante, o processo de acúmulo de lipídeos é sem dúvida nenhuma um balanço entre a atividade lipogênica e a oxidação de lipídeos (78). A lipogênese no fígado possui muitos fatores controladores, tais como, SREBP1, PPAR γ , FAS e ACC, entre esses, ACC e FAS são as enzimas chaves responsáveis pela lipogênese *de novo* (79). Nosso estudo mostrou que animais KO expostos ao treinamento apresentaram uma diminuição na expressão genica dessas enzimas, sugerindo uma lipogênese *de novo* diminuída, podendo ser este, também, um dos mecanismos pelos quais esses animais apresentam redução no conteúdo de TAG hepático. Nós também observamos uma diminuição na expressão proteica da ACC total em ambos os genótipos alimentados com dieta HF e uma tendência a aumentar essa expressão quando são submetidos ao treinamento. Entretanto quando avaliamos a fosforilação da ACC, pela AMPK, em serina 79, verificamos que apenas os animais HFT WT apresentam aumento nesse parâmetro. Uma vez fosforilada pela AMPK, a ACC é inativada, perdendo sua função (80), portanto nosso resultado sugere que apesar dos animais selvagens apresentarem um conteúdo proteico total aumentado, eles também apresentam uma fosforilação aumentada, o que indica que essa proteína esta inativa e não induz a lipogênese *de novo* no fígado, resultado que não conseguimos observar nos animais KO.

Muitos estudos mostram uma forte relação entre o desenvolvimento da NASH e a inflamação hepática (81-83). No nosso modelo, 12 semanas de dieta HF houve aumento da expressão gênica de fatores importantes envolvidos na via do inflamassoma, como NLRP-3, Caspase-1, TLR-4 e NF- κ B. No entanto, esse aumento não teve relação com o desenvolvimento de um quadro inflamatório no fígado, uma vez que não houve aumento no conteúdo proteico das citocinas pró-inflamatórias em nenhum genótipo. Por outro lado, os animais KO quando submetidos ao treinamento aeróbio crônico mostraram uma resposta inflamatória exacerbada, marcada pelo

aumento de TNF- α , e IL-1 β , proteínas que agem na fase aguda da inflamação e estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento da NASH (84).

A IL-6 também foi aumentada após o protocolo de treinamento nos animais HFT KO. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com efeito imunomodulatório e metabólico (85). O efeito desta citocina sobre o quadro de esteatose hepática é controverso, já que alguns estudos demonstram que a IL-6 tem um importante papel na regeneração hepática (86-87), enquanto Yamaguchi e col.(88), mostraram que o bloqueio de IL-6 é eficiente em melhorar o quadro de deposição de gordura e a inflamação hepática.

Não obstante, moléculas quimioatraentes produzidas por hepatócitos também foram aumentadas nos animais HFT KO, como podemos observar com a elevação da IL-12, um importante quimioatraente de linfócitos (89) que está envolvido na diferenciação de células T nativas para células Th1, que assumem papel pró-inflamatório (90). Além disso, a sua expressão está altamente associada com o quadro de esteatose hepática não alcoólica em humanos (89), sendo fortemente associada com a inflamação hepática (91).

Já as citocinas IL-10 e IL-4 são citocinas anti-inflamatórias que auxiliam no processo de reparo tecidual do fígado durante o processo de doença hepática não alcoólica, (86) foram aumentados nos grupos treinados, mesmo com a sobrecarga da dieta rica em gordura.

A família dos PPARs, são conhecidas por apresentar um importante efeito inibitório sobre o processo inflamatório. Tanto que, a utilização de suplementação de ômega-3, ativa PPAR-alfa, impedindo assim a interação do NFkB com o DNA, sendo eficiente em diminuir a resposta inflamatória hepática associada a esteatose (92), e a inflamação provocada por lesão de isquemia-reperfusão (93). Agonistas de PPAR-alfa, como o fenofibrato e o WY14643, foram capazes de diminuir a inflamação hepática em animais com esteatose (94-95)

Posto isso, o fato dos animais KO apresentarem uma tendência maior ao desenvolvimento da resposta inflamatória no fígado, não é de nos causar espanto, mas sem dúvida nenhuma foi inesperado encontrar um aumento das citocinas inflamatórias no fígado dos animais HF KO submetidos ao protocolo de treinamento aeróbio moderado, visto os efeitos clássicos desse tipo de intervenção com potenciais anti-inflamatórias (96-98). Porém verificamos que os animais KO quando treinados apresentam uma queda acentuada na expressão gênica e proteica do PPAR γ , essa isoforma da família dos PPARs, que é a principal responsável pela lipogênese no

fígado, tem sido fortemente associada com resposta anti-inflamatória em monócitos e macrófagos por estimular a polarização de macrófagos para o tipo M2 assumindo um caráter anti-inflamatório (99) e no fígado por reduzir a atividade do NF- κ B (100). Essa diminuição encontrada no PPAR γ pode ser um importante ponto imunometabólico a ser discutido, já que a sua diminuição pode ter gerado a diminuição da lipogênese de novo, mas ao mesmo tempo pode ter potencializado a resposta inflamatória nesse grupo.

Tendo em vista esses resultados nós decidimos investigar se a resposta inflamatória ao exercício nos animais KO foi realmente provocada pela diminuição do PPAR γ . Para isso tratamos os camundongos PPAR α knockout com 15mg/kg/dia de rosiglitazona durante as oito semanas de treinamento.

A rosiglitazona faz parte da família das Tiazolidinedionas, uma classe de fármacos utilizada no tratamento da DM2 e de outras comorbidades associadas, que são conhecidos agonista do PPAR γ (101). Seus principais efeitos antidiabéticos estão relacionados com a redução na glicose e nos AGLs no sangue (102), bem como melhora na resposta periférica a insulina (103). No nosso estudo os camundongos que receberam rosiglitazona tiveram uma redução no valor de AGL e TAG no soro. Não conseguimos observar diferença na glicemia basal, possivelmente porque esses animais já apresentam um fenótipo de glicemia basal reduzida pela ineficiência na gliconeogênese hepática que é mediada via PPAR- α (63). Entretanto verificamos que a administração da rosiglitazona reverteu o quadro de resistência periférica à insulina, também característica desses animais, bem como melhorou a tolerância à glicose.

A rosiglitazona também é conhecida por promover o remodelamento do tecido adiposo branco, aumentando o depósito subcutâneo e diminuindo os depósitos viscerais, além de promover o aumento do tecido adiposo marrom (104-105). No nosso modelo, o grupo HFT RG KO mostrou aumento do T.A. subcutâneo, epidídimo e marrom, e diminuição do T.A. retroperitoneal, sem apresentar alteração no índice de adiposidade.

Além das ações antidiabéticas bem conhecidas, estudos tem reportado uma importante ação anti-inflamatória da rosiglitazona. Mohanty e colaboradores (2004) (106) mostraram que pacientes obesos diabéticos e não diabéticos tratados com rosiglitazona por um período de 12 semanas apresentaram diminuição na atividade do NF- κ B no fígado, bem como redução nos marcadores inflamatórios no sangue. Outros estudos reportam que a administração de rosiglitazona ativa PPAR γ , que por

sua vez estimula a polarização de macrófagos para o tipo M2, assumindo caráter anti-inflamatório (107-108).

Nossos resultados mostraram que a administração da rosiglitazona nos animais KO foi completamente eficiente em reduzir a inflamação hepática causada pelo treinamento nesse genótipo. O grupo HFT RG KO apresentou redução acentuada das citocinas pró-inflamatórias, IL-6, TNF- α , proteínas de fase aguda da inflamação (84) e MCP-1, quimiocina chave na regulação da migração e infiltração de monócitos e macrófagos no fígado (109). De maneira interessante esses animais apresentaram aumento de mRNA de TLR-4 e Myd88. Uma vez acionados TLR4/Myd88 induzem uma série de sinalizações que culminam na translocação do NF- κ B para o núcleo, aumentando sua atividade, o que acarreta em uma maior produção de IL-1 β (110), entretanto nossos resultados mostram uma diminuição tanto na expressão gênica quanto na expressão proteica desta citocina, bem como menor expressão gênica de NF- κ B. Com isso acreditamos que esse aumento na expressão gênica de TLR4/Myd88 seja uma forma de compensar a baixa ativação deste complexo.

A rosiglitazona é um importante agonista de PPAR γ , entretanto quando analisamos a expressão gênica deste receptor nuclear verificamos que o tratamento com o fármaco não reverteu a queda gerada pelo treinamento, mas promoveu o aumento dos seus genes alvos. O PPAR γ tem uma função importante no metabolismo de lipídios, sua ativação nos adipócitos promove diferenciação celular e realocação e estoque de lipídios via ativação de genes lipogênicos como LPL, FAS, SREBP1, SCD-1 entre outros (111). Neste estudo observamos significativo aumento na expressão gênica de FAS e uma tendência em aumentar SREBP1 e SCD-1. A ativação de SCD-1, pela rosiglitazona, em macrófagos se mostra importante na redução do estresse do retículo endoplasmático, diminuindo apoptose celular, o que previne eventos deletérios, como aterosclerose por exemplo (112). Além disso, encontramos aumento significativo na expressão gênica de PGC-1 α , que é um coativador dos PPARs, responsável por regular genes envolvidos no metabolismo energético e na biogênese mitocondrial (113).

F4/80 e CD86 são importantes marcadores de macrófagos do tipo M1. Um estudo recente reportou que camundongos tratados com rosiglitazona apresentaram diminuição significativa no número de macrófagos M1 F4/80⁺ (114). Já feng e colaboradores (2014) (99) mostraram menor expressão de CD86 em macrófagos tratados com agonista de PPAR γ . Nossos resultados mostraram menor expressão

gênica de F4/80 e CD86 no fígado, indicando menor expressão de macrófagos do tipo M1.

7 Conclusão

Em conclusão, esses achados sugerem que a exposição crônica à dieta hiperlipídica aumenta o acúmulo de lipídios no fígado levando ao desenvolvimento da NAFLD, e o treinamento aeróbico crônico foi eficiente em reduzir esse parâmetro por mecanismos que não dependem de PPAR α . O desenvolvimento da esteatose hepática não foi associada a inflamação no fígado em nenhum genótipo, entretanto encontramos que a ausência do PPAR α somado a uma situação de estresse leva a uma queda brusca na expressão de PPAR γ gerando uma resposta inflamatória hepática exacerbada, e a administração de rosiglitazona, um potente coativador de PPAR γ , foi eficiente em reverter essa resposta inflamatória nos animais KO treinados.

Referências *

1. WHO. Obesity 2013.
http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2013_Full.pdf
2. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro:IBGE; 2010. 130 p.
3. Golay A, Felber JP, Meyer HU, Curchod B, Maeder E, Jequier E. Study on lipid metabolism in obesity diabetes. *Metabolism*. 1984 Feb;33(2):111-6.
4. van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging*. 2015 Apr;7(4):256-68.
5. Roth J, Szulc AL, Danoff A. Energy, evolution, and human diseases: an overview. *The American journal of clinical nutrition*. 2011 Apr;93(4):875S-83.
6. Farooq W, Farwa U, Khan FR. The metabolic syndrome and inflammation: role of insulin resistance and increased adiposity. *Oman medical journal*. 2015 Mar;30(2):100-3.
7. Klover PJ, Mooney RA. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 May;36(5):753-8.
8. Hsieh FC, Lee CL, Chai CY, Chen WT, Lu YC, Wu CS. Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2013 Apr 17;10(1):35-8.
9. Di Minno MN, Russolillo A, Lupoli R, Ambrosino P, Di Minno A, Tarantino G. Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2012 Nov 7;18(41):5839-47.
10. Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2008 Dec;19(10):371-9.
11. Jiang ZG, Robson SC, Yao Z. Lipoprotein metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *J Biomed Res*. 2013 Jan;27(1):1-13.
12. Oliver E, McGillicuddy F, Phillips C, Toomey S, Roche HM. The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2010 May;69(2):232-43.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals.[2011 Jul 15]. Available from:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

13. Stojasavljevic S, Gomercic Palcic M, Virovic Jukic L, Smircic Duvnjak L, Duvnjak M. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014 Dec 28;20(48):18070-91.
14. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Dec 13;277(50):48115-21.
15. Commerford SR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wei Y, Gayles EC, Hill JO. Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Oct;279(4):E875-85.
16. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008 Jun;57(6):1470-81.
17. Ye D, Li FY, Lam KS, Li H, Jia W, Wang Y, et al. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. *Gut*. 2012 Jul;61(7):1058-67.
18. Dixon LJ, Flask CA, Papouchado BG, Feldstein AE, Nagy LE. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56100.
19. Nov O, Shapiro H, Ovadia H, Tarnovscki T, Dvir I, Shemesh E, et al. Interleukin-1beta regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability. *PLoS One*. 2013;8(1):e53626.
20. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*. 2009 Mar;10(3):241-7.
21. Huang MA, Greenson JK, Chao C, Anderson L, Peterman D, Jacobson J, et al. One-year intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with non-alcoholic steatohepatitis: A pilot study. *Am J Gastroenterol*. 2005 May;100(5):1072-81.
22. Palmer M, Schaffner F. Effect of Weight-Reduction on Hepatic Abnormalities in Overweight Patients. *Gastroenterology*. 1990 Nov;99(5):1408-13.
23. Wang RT, Koretz RL, Yee HF. Is weight reduction an effective therapy for nonalcoholic fatty liver? A systematic review. *American Journal of Medicine*. 2003 Nov;115(7):554-9.
24. Kadayifci A, Merriman RB, Bass NM. Medical treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2007 Feb;11(1):119-40, ix.
25. Foretz M, Viollet B. Regulation of hepatic metabolism by AMPK. *J Hepatol*. 2011 Apr;54(4):827-9.

26. Tsou P, Zheng B, Hsu CH, Sasaki AT, Cantley LC. A fluorescent reporter of AMPK activity and cellular energy stress. *Cell Metab*. 2011 Apr 6;13(4):476-86.
27. O'Neill HM. AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity. *Diabetes Metab J*. 2013 Feb;37(1):1-21.
28. O'Neill LA, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature*. 2013 Jan 17;493(7432):346-55.
29. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hebrard S, Lantier L, Mounier R, et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 May;196(1):81-98.
30. Bijland S, Mancini SJ, Salt IP. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Apr;124(8):491-507.
31. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF-kappaB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Jul;89(7):667-76.
32. Canto C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Oct;67(20):3407-23.
33. Zizzo G, Cohen PL. The PPAR-gamma antagonist GW9662 elicits differentiation of M2c-like cells and upregulation of the MerTK/Gas6 axis: a key role for PPAR-gamma in human macrophage polarization. *J Inflamm (Lond)*. 2015;12:36.
34. Cherkaoui-Malki M, Surapureddi S, El-Hajj HI, Vamecq J, Andreoletti P. Hepatic steatosis and peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Curr Drug Metab*. 2012 Dec;13(10):1412-21.
35. Rogge MM. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biol Res Nurs*. 2009 Apr;10(4):356-73.
36. Rinker B, Cui XD, Fink BF, Gao DY, Vasconez HC. Cryopreservation of composite tissue flaps: experimental studies in the rat. *Ann Plast Surg*. 2007 Jun;58(6):656-60.
37. Zhang S, Liu Y, Li Q, Dong X, Hu H, Hu R, et al. Exercise improved rat metabolism by raising PPAR-alpha. *Int J Sports Med*. 2011 Aug;32(8):568-73.
38. Maciejewska A, Sawczuk M, Cieszczyk P. Variation in the PPAR alpha gene in Polish rowers. *J Sci Med Sport*. 2011 Jan;14(1):58-64.
39. Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, de Souza CT, Picardi PK, Faria MC, et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol*. 2006 Dec;577(Pt 3):997-1007.
40. Bacurau RF, Navarro F, Bassit RA, Meneguello MO, Santos RV, Almeida AL, et al. Does exercise training interfere with the effects of L-carnitine supplementation? *Nutrition*. 2003 Apr;19(4):337-41.

41. FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957 May;226(1):497-509.
42. Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem*. 1996 Sep;271(36):22100-4.
43. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989 Feb;68(2):374-8.
44. Seraphim PM, Nunes MT, Machado UF. GLUT4 protein expression in obese and lean 12-month-old rats: insights from different types of data analysis. *Braz J Med Biol Res*. 2001 Oct;34(10):1353-62.
45. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
47. Guerre-Millo M, Rouault C, Poulain P, André J, Poitout V, Peters JM, et al. PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2001 Dec;50(12):2809-14.
48. Atherton HJ, Gulston MK, Bailey NJ, Cheng KK, Zhang W, Clarke K, et al. Metabolomics of the interaction between PPAR-alpha and age in the PPAR-alpha-null mouse. *Mol Syst Biol*. 2009;5:259-63.
49. Sasaki H, Ohtsu T, Ikeda Y, Tsubosaka M, Shibata S. Combination of meal and exercise timing with a high-fat diet influences energy expenditure and obesity in mice. *Chronobiol Int*. 2014 Jul:1-17.
50. Thivel D, Chaput JP, Adamo KB, Goldfield GS. Is energy intake altered by a 10-week aerobic exercise intervention in obese adolescents? *Physiol Behav*. 2014 Aug;135:130-4.
51. Hamborg B. Obesity and physical activity. *Scand J Soc Med Suppl*. 1982;29:217-20.
52. Turner D, Luzio S, Gray BJ, Dunseath G, Rees ED, Kilduff LP, et al. Impact of single and multiple sets of resistance exercise in type 1 diabetes. *Scand J Med Sci Sports*. 2014 Mar; 25(1):99-109
53. Huffman KM, Koves TR, Hubal MJ, Abouassi H, Beri N, Bateman LA, et al. Metabolite signatures of exercise training in human skeletal muscle relate to mitochondrial remodelling and cardiometabolic fitness. *Diabetologia*. 2014 Aug; 57(11):2282-95

54. Mendelson M, Michallet AS, Monneret D, Perrin C, Estève F, Lombard PR, et al. Impact of exercise training without caloric restriction on inflammation, insulin resistance and visceral fat mass in obese adolescents. *Pediatr Obes*. 2014 Aug; 10(4):311-9.
55. Berger M, Becker-Zimmermann K, Herberg L. Physical training in insulin-resistant states. *Int J Obes*. 1982;6 Suppl 1:35-40.
56. Phielix E, Meex R, Ouwens DM, Sparks L, Hoeks J, Schaart G, et al. High oxidative capacity due to chronic exercise training attenuates lipid-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2012 Oct;61(10):2472-8.
57. Calegari VC, Zoppi CC, Rezende LF, Silveira LR, Carneiro EM, Boschero AC. Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. *J Endocrinol*. 2011 Mar;208(3):257-64.
58. De Glisezinski I, Crampes F, Harant I, Berlan M, Hejnova J, Langin D, et al. Endurance training changes in lipolytic responsiveness of obese adipose tissue. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):E951-6.
59. Howlett KF, Andrikopoulos S, Proietto J, Hargreaves M. Exercise-induced muscle glucose uptake in mice with graded, muscle-specific GLUT-4 deletion. *Physiol Rep*. 2013 Aug;1(3):e00065.1-7.
60. Houmard JA, Shinebarger MH, Dolan PL, Leggett-Frazier N, Bruner RK, McCammon MR, et al. Exercise training increases GLUT-4 protein concentration in previously sedentary middle-aged men. *Am J Physiol*. 1993 Jun;264(6 Pt 1):E896-901.
61. Yessoufou A, Hichami A, Besnard P, Moutairou K, Khan NA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: Modulation of T cell differentiation. *Endocrinology*. 2006 Sep;147(9):4410-8.
62. Knauf C, Rieusset J, Foretz M, Cani PD, Uldry M, Hosokawa M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice have increased white adipose tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: Role in liver and brain. *Endocrinology*. 2006 Sep;147(9):4067-78.
63. Atherton HJ, Bailey NJ, Zhang W, Taylor J, Major H, Shockcor J, et al. A combined 1H-NMR spectroscopy- and mass spectrometry-based metabolomic study of the PPAR-alpha null mutant mouse defines profound systemic changes in metabolism linked to the metabolic syndrome. *Physiol Genomics*. 2006 Oct;27(2):178-86.
64. Xu J, Xiao G, Trujillo C, Chang V, Blanco L, Joseph SB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) influences substrate utilization for hepatic glucose production. *J Biol Chem*. 2002 Dec;277(52):50237-44.
65. Berglund ED, Kang L, Lee-Young RS, Hasenour CM, Lustig DG, Lynes SE, et al. Glucagon and lipid interactions in the regulation of hepatic AMPK signaling and expression

of PPARalpha and FGF21 transcripts in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Oct;299(4):E607-14.

66. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 1999 Jun;103(11):1489-98.
67. Arata M, Nakajima J, Nishimata S, Nagata T, Kawashima H. Nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance in children. *World J Diabetes.* 2014 Dec;5(6):917-23.
68. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Frontline Gastroenterol.* 2014 Oct;5(4):277-86.
69. Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014 Aug;28(4):637-53.
70. Neuschwander-Tetri BA. Fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Cornerstone.* 2001;3(6):47-57.
71. Goncalves IO, Maciel E, Passos E, Torrella JR, Rizo D, Viscor G, et al. Exercise alters liver mitochondria phospholipidomic profile and mitochondrial activity in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Sep;54:163-73.
72. Brandt C, Pedersen BK. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:520258.1-6.
73. Yu GS, Lu YC, Gulick T. Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase Ibeta gene promoters by fatty acid enzyme substrate. *J Biol Chem.* 1998 Dec 4;273(49):32901-9.
74. Piguet AC, Saran U, Simillion C, Keller I, Terracciano L, Reeves HL, et al. Regular exercise decreases liver tumors development in hepatocyte-specific PTEN-deficient mice independently of steatosis. *J Hepatol.* 2015 Jun;62(6):1296-303.
75. Ogborn DI, McKay BR, Crane JD, Safdar A, Akhtar M, Parise G, et al. Effects of age and unaccustomed resistance exercise on mitochondrial transcript and protein abundance in skeletal muscle of men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 Apr 15;308(8):R734-41.
76. Pearsall D, Palmer WK. Triacylglycerol metabolism in rat skeletal muscle after exercise. *J Appl Physiol (1985).* 1990 Jun;68(6):2451-6.
77. Gan Z, Rumsey J, Hazen BC, Lai L, Leone TC, Vega RB, et al. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. *J Clin Invest.* 2013 Jun;123(6):2564-75.
78. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2001 Apr;2(4):282-6.

79. Nakamuta M, Kohjima M, Morizono S, Kotoh K, Yoshimoto T, Miyagi I, et al. Evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*. 2005 Oct;16(4):631-5.
80. Munday MR, Hemingway CJ. The regulation of acetyl-CoA carboxylase--a potential target for the action of hypolipidemic agents. *Adv Enzyme Regul*. 1999;39:205-34.
81. Tzeng TF, Liou SS, Chang CJ, Liu IM. 6-gingerol protects against nutritional steatohepatitis by regulating key genes related to inflammation and lipid metabolism. *Nutrients*. 2015;7(2):999-1020.
82. Hussein O, Szvalb S, Van den Akker-Berman LM, Assy N. Liver regeneration is not altered in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) when compared to chronic hepatitis C infection with similar grade of inflammation. *Dig Dis Sci*. 2002 Sep;47(9):1926-31.
83. Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A, et al. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol*. 2006 Aug;101(8):1824-33.
84. Hammerich L, Tacke F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014;7:297-306.
85. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J*. 2013 Sep;280(17):4131-48.
86. An F, Yamanaka S, Allen S, Roberts LR, Gores GJ, Pawlik TM, et al. Silencing of miR-370 in human cholangiocarcinoma by allelic loss and interleukin-6 induced maternal to paternal epigenotype switch. *PLoS One*. 2012;7(10):e45606.
87. Wan J, Benkdane M, Alons E, Lotersztajn S, Pavoine C. M2 kupffer cells promote hepatocyte senescence: an IL-6-dependent protective mechanism against alcoholic liver disease. *Am J Pathol*. 2014 Jun;184(6):1763-72.
88. Yamaguchi K, Nishimura T, Ishiba H, Seko Y, Okajima A, Fujii H, et al. Blockade of Interleukin 6 Signaling Ameliorates Systemic Insulin Resistance through Upregulation of Glucose Uptake in Skeletal Muscle and Improves Hepatic Steatosis in High Fat Diet-fed Mice. *Liver Int*. 2014 Jul; 35(2):550-61.
89. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, et al. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Mar;27(5):412-21.
90. O'Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol*. 2000 Dec;10(12):542-50.
91. Mehta R, Birerdinc A, Neupane A, Shamsaddini A, Afendy A, Elariny H, et al. Expression of inflammation-related genes is altered in gastric tissue of patients with advanced stages of NAFLD. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:684237.1-10.

92. Tapia G, Valenzuela R, Espinosa A, Romanque P, Dossi C, Gonzalez-Mañán D, et al. N-3 long-chain PUFA supplementation prevents high fat diet induced mouse liver steatosis and inflammation in relation to PPAR- α upregulation and NF- κ B DNA binding abrogation. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Jun;58(6):1333-41.
93. Zúñiga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G, et al. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- α activation and PPAR- α /NF- κ B interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*. 2011;6(12):e28502.
94. Mohamed DI, Elmelegy AA, El-Aziz LF, Abdel Kawy HS, El-Samad AA, El-Kharashi OA. Fenofibrate A peroxisome proliferator activated receptor- α agonist treatment ameliorates Concanavalin A-induced hepatitis in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013 Dec;721(1-3):35-42.
95. Larter CZ, Yeh MM, Van Rooyen DM, Brooling J, Ghatora K, Farrell GC. Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, Wy 14,643, improves metabolic indices, steatosis and ballooning in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Feb;27(2):341-50.
96. Di Raimondo D, Tuttolomondo A, Butta C, Casuccio A, Giarrusso L, Miceli G, et al. Metabolic and anti-inflammatory effects of a home-based programme of aerobic physical exercise. *Int J Clin Pract*. 2013 Dec;67(12):1247-53.
97. Flynn MG, McFarlin BK, Markofski MM. The Anti-Inflammatory Actions of Exercise Training. *Am J Lifestyle Med*. 2007 May;1(3):220-35.
98. Timmerman KL, Amonette WE, Markofski MM, Ansinelli HA, Gleason EA, Rasmussen BB, et al. Blunted IL-6 and IL-10 response to maximal aerobic exercise in patients with traumatic brain injury. *Eur J Appl Physiol*. 2015 Jan;115(1):111-8.
99. Feng X, Qin H, Shi Q, Zhang Y, Zhou F, Wu H, et al. Chrysin attenuates inflammation by regulating M1/M2 status via activating PPARgamma. *Biochem Pharmacol*. 2014 Jun 15;89(4):503-14.
100. Chen K, Li J, Wang J, Xia Y, Dai W, Wang F, et al. 15-Deoxy- gamma 12,14-prostaglandin J2 Reduces Liver Impairment in a Model of ConA-Induced Acute Hepatic Inflammation by Activation of PPAR gamma and Reduction in NF- kappa B Activity. *PPAR Res*. 2014;2014:215631.
101. Rocchi S, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: a versatile metabolic regulator. *Ann Med*. 1999 Oct;31(5):342-51.
102. Ezhumalai M, Ashokkumar N, Pugalendi KV. Combination of carvacrol and rosiglitazone ameliorates high fat diet induced changes in lipids and inflammatory markers in C57BL/6J mice. *Biochimie*. 2015 Mar;110:129-36.

103. He J, Xu C, Kuang J, Liu Q, Jiang H, Mo L, et al. Thiazolidinediones attenuate lipolysis and ameliorate dexamethasone-induced insulin resistance. *Metabolism*. 2015 Jul;64(7):826-36.
104. Punthakee Z, Almeras N, Despres JP, Dagenais GR, Anand SS, Hunt DL, et al. Impact of rosiglitazone on body composition, hepatic fat, fatty acids, adipokines and glucose in persons with impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance: a sub-study of the DREAM trial. *Diabet Med*. 2014 Sep;31(9):1086-92.
105. Tai TA, Jennermann C, Brown KK, Oliver BB, MacGinnitie MA, Wilkison WO, et al. Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes brown adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 1996 Nov 22;271(47):29909-14.
106. Mohanty P, Aljada A, Ghanim H, Hofmeyer D, Tripathy D, Syed T, et al. Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2728-35.
107. Ballesteros I, Cuartero MI, Pradillo JM, de la Parra J, Perez-Ruiz A, Corbi A, et al. Rosiglitazone-induced CD36 up-regulation resolves inflammation by PPARgamma and 5-LO-dependent pathways. *J Leukoc Biol*. 2014 Apr;95(4):587-98.
108. Lefevre L, Gales A, Olaghier D, Bernad J, Perez L, Burcelin R, et al. PPARgamma ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal Candida elimination. *PLoS One*. 2010;5(9):e12828.
109. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Jun;29(6):313-26.
110. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004 Feb;16(1):3-9.
111. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013 May;19(5):557-66.
112. Ikeda J, Ichiki T, Takahara Y, Kojima H, Sankoda C, Kitamoto S, et al. PPARgamma Agonists Attenuate Palmitate-Induced ER Stress through Up-Regulation of SCD-1 in Macrophages. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128546.
113. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*. 2003 Feb;24(1):78-90.
114. Hasegawa-Moriyama M, Ohnou T, Godai K, Kurimoto T, Nakama M, Kanmura Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates postincisional pain by regulating macrophage polarization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Sep 14;426(1):76-82.