

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

2021

**Mecanismos moleculares  
relacionados ao aumento do conteúdo  
hepático de gordura em resposta ao  
excesso de exercício físico**



**PPGRDF**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
REABILITAÇÃO E DESEMPENHO FUNCIONAL  
FMRP-USP



Ana Paula Pinto

Tese  
Doutorado

ANA PAULA PINTO

**Mecanismos moleculares relacionados ao aumento do conteúdo hepático de gordura em resposta ao excesso de exercício físico**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação Serviço de Documentação da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo

Nome: PINTO, Ana Paula

**Título: Mecanismos moleculares relacionados ao aumento do conteúdo hepático de gordura em resposta ao excesso de exercício físico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para título de Doutor no Programa de Pós-graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

**A minha Mãe, exemplo de amor e dedicação**

**Ao meu pai.**

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pelo fomento e apoio à pesquisa;

Aos meus amigos e companheiros de laboratório pelo trabalho feito em equipe;

Ao meu orientador Prof. Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva, pelo apoio, compreensão, carinho, ideias e motivação;

Aos alunos do laboratório em Waterloo, e ao Prof. Dr. Joe Quadrilatero, por me receberem de braços abertos;

A todos os nossos colaboradores, pelas contribuições em nossos projetos;

A todos os funcionários e professores da Escola de Educação Física e Esporte de Ribeirão Preto, assim como da USP, pelo acolhimento;

Aos parceiros do dia a dia e a todos os meus amigos;

A minha mãe, a Elisa, ao meu pai, e aos meus pets, por sempre estarem presente e me oferecerem todo suporte;

À Deus;

Aos animais experimentais, por contribuírem com o avanço da ciência;

À CAPES e ao CNPQ;

E a todos aqueles que de alguma forma me apoiaram e desejaram o sucesso do trabalho.

**MEU MUITO OBRIGADA.**



**processo número: 2017/19869-8**

**processo número: 2019/15428-2**

## RESUMO

PINTO, AP. **Mecanismos moleculares relacionados ao aumento do conteúdo hepático de gordura em resposta ao excesso de exercício físico.** 2021. 58f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O exercício excêntrico excessivo levou ao acúmulo de gordura hepática, o que ocorreu concomitantemente com a elevação das principais proteínas do complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1) e da via de sinalização da insulina. Uma vez que a mTORC1 e a insulina podem inibir a via da autofagia e explicar a elevação do conteúdo de lipídio no fígado, o principal objetivo da presente investigação foi verificar a resposta dos genes e proteínas relacionados as vias da autofagia e lipogênese no tecido hepático de camundongos submetidos ao protocolo de corrida excessivo em declive com e sem a administração de rapamicina, uma droga que inibe a via da mTORC1. Camundongos C57BL/6 foram divididos em quatro grupos experimentais: Controle (CT; sedentário), Excesso de exercício físico em declive (EE), Excesso de exercício físico em declive com administração crônica de rapamicina (EE/Rapa) e Endurance (END). Ao final do protocolo de 8 semanas de exercício, o sangue e o fígado foram coletados para análise sérica, histologia, imunohistoquímica, conteúdo de gordura hepática, reação em cadeia da polimerase em tempo real e *immunoblotting*. Os principais resultados foram: 1) elevação dos níveis de glicose, insulina, HOMA-IR, cortisol, ALT e colesterol, mas níveis mais baixos de T4 para o grupo EE/Rapa; 2) acúmulo de gordura hepática para os grupos EE e EE/Rapa; 3) aumento de LC3 por imunoprecipitação e diminuição dos genes autofágicos para os grupos EE, EE/Rapa e END; 4) redução da fosforilação de p70S6K e aumento da fosforilação de Foxo1A para o grupo EE/Rapa. Em resumo, o exercício excessivo com ou sem rapamicina levou ao aumento do conteúdo de gordura no fígado. Embora a rapamicina tenha sido eficaz na inibição de mTOR, a via da autofagia não foi regulada positivamente.

**Palavras Chaves:** Autofagia; Exercício; Hormônios; Lipogênese; mTOR.

## ABSTRACT

PINTO, AP. **Molecular mechanisms related to increased hepatic fat content in response to excessive physical exercise.** 2021. 58 pages. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021

The excessive eccentric exercise led to hepatic fat accumulation, which occurred concomitantly with elevation in the main proteins of the mammalian target of the rapamycin complex 1 (mTORC1) and insulin signaling pathways. Since mTORC1 and insulin can inhibit the autophagy pathway and explain the liver lipid content elevation, the main objective of the present investigation was to verify the responses of genes and proteins related to the autophagy and lipogenesis pathways in the hepatic tissue of mice submitted to the excessive downhill running protocol with and without rapamycin administration, a drug able to inhibit the mTORC1 pathway. C57BL/6 mice were divided into four experimental groups: Control (CT; sedentary), Excessive exercise in downhill running (EE), Excessive exercise in downhill running with chronic administration of rapamycin (EE/Rapa), and Endurance exercise (END). At the end of the 8-week protocols, the blood and liver were collected for serum analysis, histology, immunohistochemistry, hepatic fat content, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, and immunoblotting. The main results were: 1) higher levels of glucose, insulin, HOMA-IR, cortisol, ALT, and cholesterol, but lower levels of T4 for the EE/Rapa group; 2) hepatic fat accumulation for the EE and EE/Rapa groups; 3) upregulation of LC3 immunoexpression and downregulation of autophagic genes for the EE, EE/Rapa, and END groups; 4) reduction of p70S6K phosphorylation and increase of Foxo1A phosphorylation for the EE/Rapa group. In summary, excessive exercise in downhill running with or without rapamycin led to increased liver fat content. Although rapamycin was effective in inhibiting mTOR, the autophagy pathway was not upregulated.

**Keywords:** Autophagy; Exercise; Hormones; Lipogenesis; mTOR.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Protocolo de EE .....	<b>24</b>
<b>Tabela 2.</b> Protocolo de END .....	<b>25</b>
<b>Tabela 3.</b> Desenho dos <i>primers</i> .....	<b>28</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da autofagia .....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática dos procedimentos experimentais (A). Peso corporal (B). Relação peso do fígado/peso corporal (C). Teste de carga incremental (D). Teste de Rotarod (E).....	<b>31</b>
<b>Figura 3.</b> Níveis séricos de glicemia (A), insulina (B), HOMA-IR (C), HOMA-%B (D), HOMA-%S (E), cortisol (F), AST (G), ALT (H), colesterol (I), triglicerídeos (J), testosterona (K), e T4 (L).....	<b>33</b>
<b>Figura 4.</b> Caracterização histológica (x400) dos hepatócitos por hematoxila e eosina (HE), Oil-red, e ácido periodico Schiff (PAS). Bar=20µm. (A), Glicogênio (B), Oil-red (C), Área do Oil-red (D).....	<b>34</b>
<b>Figura 5.</b> Caracterização imunohistoquímica (x400) de hepatócitos por Sqstm1/p62 e LC3B (A), imunoexpressão da Sqstm1/p62 (B), imunoexpressão da LC3B (C), bandas com kDa (D), níveis proteicos de Sqstm1/p62 (E) e LC3II (F).....	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b> Níveis de RNAm de <i>Prkaa1</i> e <i>Mtor</i> (A); <i>Foxo1</i> e <i>Foxo3</i> (B); <i>Ulk1</i> e <i>Becn1</i> (C); <i>Mapllc3b</i> e <i>Sqstm1</i> (D); <i>Atg5</i> e <i>Bnip3</i> (E); <i>Srebfl</i> e <i>Fasn</i> (F); <i>Ppargc1a</i> e <i>Ppard</i> (G); e <i>Acacb</i> (H).....	<b>37</b>
<b>Figura 7.</b> Membranas de cada experimento com respectivos kDa (A); Conteúdo proteico de p-Ampk (Thr172)/Ampk (B); p-mTOR (Ser2448)/mTOR (C); p-p70S6K (Thr389)/p70S6K (D); p-Foxo1A (Ser256)/Foxo1A (E); p-Foxo3A (Ser253)/Foxo3A (F); p-ULK1 (Ser556)/ULK1 (G); p-ACC (Ser79)/ACC (H); SCD1/Beta-actina (I).....	<b>38</b>
<b>Figura 8.</b> Principais achados da presente investigação.....	<b>42</b>

## LISTA DE ABREVIACÕES

Acetil-CoA - acetil-coenzima A;

AFV - atividade física voluntária;

Akt – proteína quinase B;

ALT - alanina aminotransferase;

Ambra1 - autofagia regulada por Beclin-1;

AMPK - proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina;

ANOVA – análise de variância;

AST - aspartato aminotransferase;

BCL-2 - célula B de linfoma 2;

BECN1 ou Beclin-1 - mamíferos *de* Atg6 *de* leveduras;

BSA - soro bovino;

CBM20 - domínio de ligação a carboidrato 20;

CMA - autofagia mediada por chaperona;

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;

CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP;

CT – controle;

EE - excesso de exercício físico em declive;

EE/Rapa - exercício físico em declive com administração crônica de rapamicina;

END – endurance;

FIP200 ou ATG17 - proteína quinase de interação familiar de 200 kDa de adesão focal;

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;

HE - hematoxilina e eosina;

HIT – treinamento de alta intensidade;

HOMA-% B - função das células  $\beta$ ;

HOMA-% S - sensibilidade à insulina;

HOMA-IR - resistência à insulina;

HSC70 - proteína de choque térmico cognata de 71 kDa;

LAMP2A - proteína da membrana lisossomal;

LC3 I - cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos;

mTOR - alvo mecanístico da rapamicina;

mTORC1 - complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos;

NAFLD - doença hepática gordurosa não alcoólica;

PAS - ácido periódico de Schiff;

PDK1 - quinase 1 dependente de PI;

PIK3C3/VPS34 - fosfatidilinositol 3-quinase;

Pmax - potência máxima;

PPAR $\alpha$  - proliferador de peroxissoma;

RTq-PCR - reação em cadeia da polimerase em tempo real;

SNARES - NSF solúvel;

Sqstm1/p62 - sequestossomo 1;

SREBP-1C - fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol;

STBD1 - proteína domínio de ligação de amido 1;

T4 - tiroxina;

TCI – teste de carga incremental;

TFEB - fator de transcrição EB;

ULK - complexo da proteína autofágica;

ULK1 ou ATG1 - proteína autofágica 1.

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
1.1. O fígado .....	14
1.2. Via da autofagia .....	15
1.3. Funções da autofagia no fígado .....	17
1.4. Exercício e autofagia hepática .....	19
<b>2. INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
3.1. Animais experimentais .....	22
3.2. Avaliação do desempenho físico .....	23
3.3. Teste de carga incremental (TCI) .....	23
3.4. Teste de rotarod .....	23
3.5. Excesso de exercício físico em declive (EE) .....	23
3.6. Excesso de exercício físico em declive com injeções intraperitoneais de rapamicina (EE/Rapa) .....	24
3.7. Protocolo de endurance (END) .....	24
3.8. Níveis de glicose, coleta de sangue e extração do tecido hepático .....	25
3.9. Análises séricas .....	25
3.10. Histologia .....	26
3.11. Marcação por Oil-red .....	26
3.12. Imunohistoquímica .....	27
3.13. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RTq-PCR) .....	27
3.14. Técnica de immunoblotting .....	28
3.15. Fluxo autofágico .....	29
3.16. Análise estatística .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	30
4.1. O exercício excessivo diminuiu o desempenho na semana 8 .....	30
4.2. O exercício excessivo combinado com o tratamento com rapamicina aumentou a glicemia, insulina, HOMA-IR, cortisol, ALT e colesterol, mas reduziu os níveis de T4 ..	31
4.3. Apesar do tratamento com rapamicina, o exercício excessivo aumentou o teor de gordura hepática .....	33
4.4. Todos os grupos de exercício aumentaram a imunoexpressão de LC3B, mas apenas a combinação de exercício excessivo e rapamicina reduziu os níveis de Sqstm1/p62 após o tratamento com colchicina .....	35
4.5. Todos os grupos de exercício reduziram a expressão de genes da via da autofagia ..	36
4.6. O exercício excessivo combinado com o tratamento com rapamicina inibiu a fosforilação de p70S6K e aumentou a fosforilação de Foxo1A .....	37
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>6. ARQUIVO SUPLEMENTAR 1</b> .....	43

<b>7. BOLSA ESTÁGIO DE PESQUISA NO EXTERIOR (BEPE)</b> .....	44
<b>8. TRABALHOS CIENTÍFICOS INTERNACIONAIS</b> .....	46
<b>8.1. Primeiro autor</b> .....	46
<b>8.2. Colaborações</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. O fígado

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano e sua unidade funcional básica é o lobo hepático. O fígado processa e sintetiza muitas substâncias como carboidratos, lipídios e proteínas (1). No metabolismo de carboidratos, o fígado executa o armazenamento de glicogênio, realiza gliconeogênese, conversão de frutose e galactose em glicose e formação de compostos químicos a partir do metabolismo de carboidratos (2). Já as funções do fígado no metabolismo lipídico estão envolvidas na oxidação de ácidos graxos para fornecer energia, síntese de gordura a partir de carboidratos e proteínas, bem como na síntese de colesterol, fosfolipídios e lipoproteínas. O metabolismo das proteínas está relacionado à desaminação de aminoácidos, à formação de proteínas plasmáticas, à formação de ureia para remover a amônia e à síntese de outros compostos a partir dos aminoácidos (1).

O fígado é essencial para manter a glicose no sangue. O armazenamento de glicogênio hepático permite a retirada dos níveis excessivos de glicose no sangue e o retorno desse substrato do fígado ao sangue quando os níveis de glicose são reduzidos. A gliconeogênese ocorre quando as concentrações de glicose caem abaixo dos níveis normais. Assim, o fígado converte os aminoácidos e o glicerol dos triglicerídeos em glicose, ajudando a manter níveis glicêmicos aceitáveis (1). A energia dos lipídios precisa da decomposição da gordura em glicerol e ácidos graxos. Os ácidos graxos são divididos em radicais acetil de dois carbonos, formando a acetil-coenzima A (acetil-CoA), que pode entrar no ciclo do ácido cítrico para ser oxidada e liberar energia. No entanto, o fígado não pode usar toda a acetil-CoA formada, assim, parte do Acetil-CoA é convertida em ácido acetoacético - um ácido solúvel que passa das células do fígado para o fluido extracelular - sendo transportado para o corpo e absorvido por outros tecidos. Esses tecidos convertem o ácido acetoacético em acetil-CoA e o oxidam da maneira usual (1).

A formação hepática de ureia é essencial para a remoção de amônia dos fluidos corporais. A amônia é formada principalmente pela desaminação de aminoácidos, que ocorrem antes de poder ser usada como energia ou convertida em carboidratos (1). Devido à importância do fígado para o metabolismo, o processo e a síntese de substâncias, distúrbios ou disfunções estão associados a sintomas patológicos (1). A autofagia permite que o fígado controle de forma eficiente e precisa a qualidade e a quantidade de organelas citoplasmáticas, incluindo mitocôndrias, peroxissomos e gotículas lipídicas (3).

## 1.2. Via da autofagia

Autofagia é derivada das palavras gregas “auto”, que significa “eu”, e “fagia”, que significa “comer”, ou seja, “comer a si mesmo” (4). A autofagia foi descrita pela primeira vez no rim e no fígado, como uma resposta à inanição (5). A autofagia gera diversas reações moleculares que resultam na degradação de componentes intracelulares, tendo o lisossoma como destino final (6-8). Alguns tipos de autofagia diferem na forma como o material citoplasmático é entregue aos lisossomos, sendo elas a macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperona (3, 8).

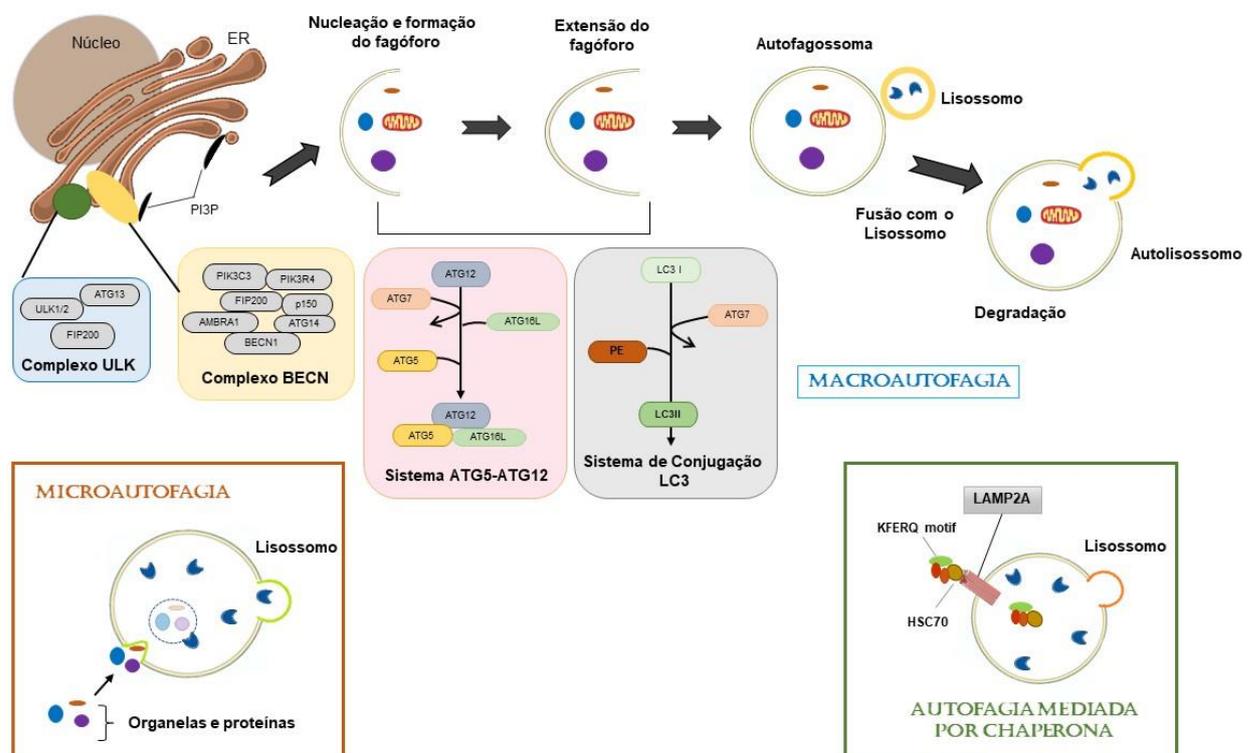
A microautofagia envolve a captação e a degradação do conteúdo citoplasmático que está próximo do endossomo e do lisossomo (3). A microautofagia envolve os materiais intracelulares para ativar a degradação. A autofagia mediada por chaperona (CMA) é exclusiva para proteínas com o pentapeptídeo KFERQ (KFERQ motif), que são reconhecidas pela proteína de choque térmico cognata de 71 kDa (HSC70, também conhecida como HSPA8), no citosol. Aproximadamente 30% das proteínas citosólicas apresentam o pentapeptídeo KFERQ, incluindo enzimas do metabolismo intermediário. O HSC70 promove a translocação das proteínas alvo sobre as membranas lisossomais para o lúmen lisossomal por meio de interações com a proteína da membrana lisossomal (LAMP2A) (3, 8).

A via mais estudada é a da macroautofagia, que será aqui chamada de autofagia. A via da autofagia é responsável pela reciclagem intracelular e atua em condições basais, mas também é estimulada em condições de estresse como restrição calórica e exercício físico (9). A autofagia é regulada por mais de 30 genes, 18 dos quais são genes cruciais para a formação dos autofagossomos (10). A autofagia abrange várias etapas após a indução (11), como iniciação e regulação do pré-fagóforo, também conhecido como PAS; alongamento e expansão do fagóforo (ou fagoporo); formação e maturação do autofagossomo, que se funde com os lisossomos para formar os autolisossomos para degradação (12). Em aproximadamente 70% do seu contexto, a indução da autofagia tem papel citoprotetor (13). A insulina e/ou glicose, assim como os aminoácidos, regulam a atividade autofágica (10).

O processo é iniciado com a formação do complexo da proteína autofágica (ULK), composto pela proteína autofágica 1 (ATG1 ou ULK1), ATG13 e a proteína quinase de interação familiar de 200 kDa de adesão focal (FIP200 ou ATG17) (14, 15). Com isso, ocorre a iniciação do mecanismo e a ativação de um segundo complexo, denominado de BECN, que contém o ortólogo em mamíferos de Atg6 de leveduras (BECN1 ou Beclin-1), a fosfatidilinositol 3-quinase (PIK3C3/VPS34), ATG14, p150 e a autofagia regulada por Beclin-

1 (Ambra1) (10, 16). Nessa etapa, a Beclin-1 se encontra dissociada da célula B de linfoma 2 (BCL-2), e esta dissociação é responsável pela condução do complexo BECN para a membrana do fagóforo, iniciando a nucleação (17).

Após a iniciação e nucleação do PAS, o processo de alongamento do fagóforo é ativado. Ambos os complexos (complexo ULK e BECN) sinalizam para ativação da ATG7 que catalisará a conjugação da ATG5 e ATG12. Após a conjugação, o complexo ATG5/ATG12 liga-se à ATG16L gerando o alongamento do fagóforo. As proteínas ATG7 e ATG3 geram a lipidação da cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3 I), formando a LC3 II que se conjuga a uma fosfatidiletanolamina gerando o fechamento do fagóforo em autofagossomo. Além disso, o complexo ATG5-ATG12-ATG16L funciona como uma enzima semelhante a E3, determinando o local de lipidação de LC3 (18). A LC3 II também interage diretamente com a sequestossomo 1 (Sqstm1/p62), proteína que marca quem deve ser envolto pelo autofagossoma e degradado por autofagia (7, 11, 12, 19-22). As ações dos microtúbulos garantem o transporte preciso do autofagossomo ao lisossoma para fusão (23). Após a fusão com o lisossoma para formar o autolisossomo, ocorre a degradação (24). A Figura 1 resume o processo autofágico descrito acima.



**Figura 1** - Representação esquemática da autofagia. O processo começa com a formação dos complexos ULK e BECN iniciando a nucleação. A ativação de ATG7 catalisa a conjugação de ATG5 e ATG12 e, junto com ATG16L, resulta no alongamento do fagóforo. ATG7 e ATG3 auxiliam na lipidação de LC3I em LC3II, que é então conjugado a uma fosfatidiletanolamina, resultando no fechamento do fagóforo. A fusão com lisossomos forma autolisossomos que degradam o conteúdo intracelular. As biomoléculas resultantes são recicladas de volta para o

citoplasma. As figuras foram modificadas do Servier Medical Art, licenciado sob uma Creative Common Attribution 3.0 Generic License. <http://smart.servier.com/>.

Ainda não está bem definido como as células identificam a necessidade de aumentar a atividade autofágica, mas isso provavelmente ocorre por múltiplos mecanismos, dependente do tipo de estímulo. Assim que o sinal de ativação da autofagia é transduzido, os ATGs controlam as etapas da via da autofagia (formação de autofagossomo para degradação de carga). Junto com sua reorganização de complexos inativos para ativos, a magnitude e a duração da ativação da autofagia são moduladas pelos níveis de expressão de ATG em resposta a diferentes programas de transcrição (25). Um desses transcricionais é o fator de transcrição EB (TFEB), impulsionando a via da autofagia em várias etapas (26). O TFEB aumenta a biogênese lisossomal; gerencia a expressão dos genes *Atg* para prevenir a depleção da proteína ATG; e controla os genes necessários em outras etapas da autofagia, como o receptor de fixação de NSF solúvel (SNARES) para fusão da membrana e hidrolases específicas (26, 27). Outras moléculas também podem regular a autofagia, como no estado de jejum, a qual a proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP (CREB) e o receptor-alfa ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR $\alpha$ ) monitoraram a regulação da transcrição da autofagia (25, 28).

A autofagia pode ser modificada em três níveis da sua via: 1) antes da formação do autofagossomo, por meio da modulação da atividade de fatores de transcrição, como o TFEB; 2) durante a formação do autofagossomo, em etapas como iniciação e nucleação; 3) durante a maturação do autofagossomo quando ele se funde com o compartimento lisossomal (8). A interferência no processo da autofagia pode contribuir para a patogênese de diversas doenças, como doenças associadas ao fígado, câncer, doenças infecciosas e doenças neurodegenerativas (29). Portanto, os esforços atuais estão focados em compreender as vias moleculares que conduzem este sistema.

### **1.3. Funções da autofagia no fígado**

A autofagia hepática é vital para o *clearance* de organelas danificadas e anormais, bem como proteínas que podem se acumular e levar à hepatotoxicidade (6). O papel central da autofagia hepática inclui a adaptação à inanição (fome) por meio do início da glicogenólise, lipólise e catabolismo de proteínas, que ocorrem nessa ordem durante a privação severa de nutrientes (3). O nível da autofagia hepática está correlacionado com o ciclo alimentação-jejum, que é controlado pela insulina, glucagon e aminoácidos (30).

A autofagia seletiva regula características importantes do metabolismo hepático, como por exemplo a  $\beta$ -oxidação. A autofagia seletiva é um tipo de autofagia que degrada produtos em vias metabólicas hepáticas muito reguladas espaço-temporalmente e é controlada principalmente por marcação do material a ser degradado (3). A seguir, apresentaremos alguns dos mecanismos moleculares da autofagia seletiva no contexto das vias metabólicas.

### **Glicofagia**

A autofagia contribui para manter o equilíbrio energético no fígado por meio do catabolismo do glicogênio, um dos importantes estoques de energia hepática (6, 31). Os autofagossomos envolvem seletivamente os grânulos de glicogênio para o catabolismo em glicose. A proteína domínio de ligação de amido 1 (STBD1), que é expressa em altos níveis em tecidos de armazenamento de glicogênio, como músculo e fígado, liga o glicogênio por meio de um domínio de ligação a carboidrato 20 (CBM20) (32, 33). As mutações no domínio STBD1-CBM20 geram um acúmulo de glicogênio em linhas de células humanas. STBD1 se conecta preferencialmente ao glicogênio que é menos ramificado para destruição por autofagia seletiva (33).

### **Lipofagia**

A lipofagia é uma autofagia seletiva e foi observada pela primeira vez no fígado de camundongos, onde as gotículas de lipídios foram englobadas pelo autofagossomo e transportadas para os lisossomos para serem decompostas pelas lipases lisossomais residentes (34). Durante a inanição, um programa de transcrição é iniciado no fígado para preparar o sistema autofágico/lisossomal, que inclui organelas e conteúdo enzimático para a chegada e processamento dos lipídios (27). A contribuição da lipofagia para a lipólise em condições normais pode ser discreta, mas a lipofagia evita o acúmulo de lipídios hepáticos em resposta à sobrecarga de lipídios na dieta (6).

A inibição da autofagia nos hepatócitos aumenta o armazenamento de triacilglicerol em gotículas de lipídios, levando ao acúmulo de lipídios hepáticos. Além disso, o aumento do armazenamento de triacilglicerol é devido ao comprometimento da lipólise e não ao aumento em sua síntese, sugerindo que a autofagia desempenha um papel essencial na lipólise (35, 36). Animais com superexpressão de ATG7 no fígado tiveram indução da autofagia levando à redução da esteatose hepática, reforçando assim a função lipolítica da autofagia (37). Não são apenas os ácidos graxos, mas também a composição lipídica da membrana que podem influenciar o comportamento da via autofágica. A exposição a altas concentrações de lipídios

modifica a composição da membrana, diminuindo a capacidade de fusão dos autofagossomos e lisossomos (38).

#### 1.4. Exercício e autofagia hepática

O exercício físico tem vários benefícios à saúde, como a expansão da expectativa de vida e proteção contra doenças como diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer e outras (39). O exercício físico é dividido em duas categorias básicas: a) atividades aeróbicas, também conhecidas como exercício de *endurance*, que são rítmicas e envolvem grandes músculos, como a corrida; b) exercícios de resistência ou força, que utilizam a resistência à contração muscular (40, 41).

A alta demanda metabólica do músculo em atividade durante o exercício não pode ser atendida sem uma resposta robusta do fígado (42). O fígado armazena, libera e recicla energia. As demandas energéticas do fígado são alcançadas pelo aumento da oxidação de ácidos graxos, mobilizados do tecido adiposo. As adaptações após o exercício físico facilitam a reposição dos estoques de glicogênio. O glucagon e a insulina orquestram a resposta hepática durante e após o exercício físico. O fígado se adapta às repetidas demandas do exercício, assim como o músculo esquelético, aumentando a capacidade de produção de energia e oxidação de gordura (42, 43).

Uma das principais questões ainda desconhecidas nos estudos sobre autofagia hepática e exercício físico é como o músculo se comunica com os outros órgãos, como o fígado, sinalizando o início da autofagia (44). O músculo esquelético é um órgão endócrino que secreta hormônios, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, que coletivamente são denominadas miocinas. As miocinas podem estar envolvidas na indução da autofagia durante e após o exercício físico (45).

O exercício de *endurance* é um indutor não farmacológico da autofagia (46). O benefício do exercício de *endurance* depende de sua intensidade (47). No entanto, os mecanismos fisiológicos e moleculares pelos quais o exercício de *endurance* ativa a autofagia hepática ainda não estão claros (46). Até onde sabemos, poucos estudos demonstraram o impacto do exercício físico na via autofágica em fígados saudáveis, sem a presença de patologias ou dietas hiperlipídicas (46-49).

Kwon *et al.* (46) verificaram a ligação entre autofagia e exercício de endurance de curto prazo no tecido hepático. Camundongos machos C57BL/6 correram em uma esteira por cinco dias por 60 minutos. O exercício promoveu a ativação da LC3 II, ATG7, e fosforilação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (p-AMPK), bem como inibição da Sqstm1/p62 (46). Uma vez que a Sqstm1/p62 e a LC3 II se ligam a moléculas celulares para serem degradadas pelos lisossomos, uma diminuição dos níveis de Sqstm1/p62 com um aumento da LC3 II é considerada uma indicação do fluxo autofágico na maioria dos estudos. Pauly *et al.* (11) investigaram os efeitos do treinamento de alta intensidade (HIT) em hipóxia e verificaram que no tecido hepático as proteínas da via da autofagia não foram moduladas com o exercício (11).

Gunadi *et al.* (47) verificaram os níveis autofágicos em ratos Wistar submetidos a diferentes intensidades de exercício (baixa, moderada e alta intensidade). Oito semanas de treinamento em esteira foram realizadas cinco dias na semana, durante 30 minutos, a 10, 20 e 30 m/min, respectivamente. A expressão de RNAm de *Map1lc3b* diminuiu no fígado dos animais submetidos a intensidades baixa, moderada e alta, enquanto a expressão de RNAm de *Sqstm1* diminuiu nas intensidades moderada e alta. Os níveis proteicos de Beclin-1 e LC3 II aumentaram em todas as intensidades de exercício. Enquanto os níveis da proteína ATG5 aumentaram nas intensidades moderada e alta, Sqstm1/p62 diminuiu nessas sessões de exercício. O aumento dos níveis proteicos de Beclin-1, LC3 II e ATG5, seguido pela redução dos níveis de Sqstm1/p62, reflete um aumento da atividade da autofagia (47). Santos-Alves *et al.* (48) verificaram o impacto do treinamento crônico de endurance (END) e da atividade física voluntária (AFV) no controle celular e mitocondrial do fígado. Ratos Sprague–Dawley correram na esteira ou foram expostos a roda livre voluntária por 12 semanas. O protocolo de END aumentou o conteúdo proteico da Beclin-1, Sqstm1/p62, enquanto o AFV reduziu o conteúdo proteico da Beclin-1. Ambos os protocolos de exercício aumentaram o conteúdo proteico de LC3 II. Apesar das diferenças entre os efeitos do exercício na regulação das proteínas avaliadas, tanto o END quanto o AFV aumentaram a sinalização autofágica, o que pode estar envolvido na fisiologia hepática (48).

Bayod *et al.* (49) analisaram os efeitos do treinamento em esteira (36 semanas) no processo de autofagia em ratos Sprague-Dawley. A razão LC3II/I e Beclin-1 não tiveram alterações significativas. A fosforilação do alvo mecanístico da rapamicina (mTOR) e os níveis de Sqstm1/p62 aumentaram após o exercício. Assim, os autores acreditam que a ativação de

mTOR e os níveis mais elevados de Sqstm1/p62 no fígado após o exercício podem estar relacionados aos efeitos metabólicos em vez de inibição da autofagia, regulando aspectos como controle de energia e adipogênese (49). Diversas investigações (46-51) demonstraram aumento de LC3 II e diminuição dos níveis de Sqstm1/p62; no entanto, esses estudos não mediram especificamente o fluxo autofágico. As recomendações atuais para avaliar o fluxo autofágico *in vivo* empregam o uso de inibidores para monitorar o autofagossomo e o *turnover* específico de proteínas autofágicas. Avaliar genes e proteínas da autofagia sem considerar o fluxo tem suas limitações, uma vez que as possíveis alterações encontradas não fornecem uma distinção clara entre ativação ou inibição autofágica (52). Apenas dois estudos (53, 54) avaliaram o fluxo autofágico usando um inibidor farmacológico no fígado após o exercício, enquanto a maioria não (11, 46, 47, 49-51, 55-57). Esses dois estudos verificaram que o fluxo de LC3 II e Sqstm1/p62 não foi modulado pelo exercício físico crônico (53, 54).

Possíveis hipóteses para o mecanismo que coordena os eventos de controle de qualidade no fígado após o exercício podem estar associadas à modificação no conteúdo e/ou atividade de proteínas essenciais que estão no controle das alterações pós-traducionais, influenciando a atividade, o tráfego ou os processos de translocação através de (des)fosforilação, (de)metilação e (des)acetilação. (49, 58). Nas últimas décadas, diversos estudos investigaram a respeito da regulação da autofagia e sua função na fisiologia e fisiopatologia dos tecidos. No entanto, sabe-se relativamente pouco sobre a regulação autofágica hepática durante o exercício, principalmente sua resposta a diferentes protocolos de exercício físico. Embora algumas investigações tenham avaliado os efeitos do exercício na autofagia hepática, pesquisas futuras devem se concentrar no uso de ensaios adicionais para medir o fluxo autofágico. É necessário controlar as variáveis relacionadas à prescrição do treinamento como intensidade, volume e frequência.

## 2. INTRODUÇÃO

O treinamento físico induz a uma quebra da homeostase, gerando melhora do desempenho físico devido ao princípio da supercompensação. Para atingir essas adaptações positivas, o treinamento de sobrecarga excessiva deve ser evitado (59). O desequilíbrio entre o treinamento físico de alta intensidade e períodos inadequados de recuperação (ou seja, *overtraining*/OT) pode levar à estagnação ou diminuição do desempenho (59). Utilizando um protocolo de *overtraining* baseado em sessões de corrida em excesso em declive, da Rocha *et al.* (60, 61) observaram aumento nas proteínas principais do complexo 1 do alvo da rapamicina

em mamíferos (mTORC1) e na via de sinalização da insulina, acompanhado de sinais de inchaço celular, inflamação aguda e acúmulo de gordura no tecido hepático de camundongos. A ativação das vias de sinalização da mTORC1 e insulina estão relacionadas à inibição da autofagia (21, 62), enquanto a administração de rapamicina, uma droga que inibe a proteína mTORC1, pode estimular a autofagia (63).

No fígado, especialmente na forma de microlipofagia ou lipofagia, a autofagia regula o armazenamento intracelular de lipídios degradando gotículas de lipídios e liberando ácidos graxos no citosol, o que ocorre como uma resposta rápida ao jejum (35). A inibição da autofagia nos hepatócitos aumenta o armazenamento de triglicerídeos nas gotículas lipídicas, levando ao acúmulo de gordura no fígado. A elevação no armazenamento de triglicerídeos ocorre devido à lipólise prejudicada e não à sua síntese elevada, sugerindo que a autofagia desempenha um papel vital na lipólise (35, 36). Além disso, a ativação da autofagia por superexpressão específica no fígado do gene *Atg7* diminuiu a esteatose significativamente, destacando o papel lipolítico da autofagia (64).

Com base nos achados publicados anteriormente por da Rocha *et al.* (2, 3), é possível hipotetizar que a ativação de ambas as vias de sinalização de mTORC1 e insulina podem ter desempenhado um papel fundamental no acúmulo de gordura hepática através da inibição da autofagia (21, 62), o que prejudicaria a lipofagia e, portanto, a degradação das gotículas de lipídios. Portanto, o objetivo principal da presente investigação foi verificar as respostas dos genes e proteínas relacionadas às vias da autofagia e lipogênese no fígado de camundongos submetidos ao protocolo de corrida em excesso em declive com e sem administração de rapamicina. Como grupo controle positivo, para comparar os resultados observados nos camundongos *overtreinados*, utilizamos um protocolo de treinamento físico de endurance vinculado a resultados positivos (65).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais experimentais**

Camundongos machos C57BL/6 com 6 semanas de vida provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto foram mantidos em micro-isoladores, em rack ventilada (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), três animais por gaiola, com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) em um ciclo normal de 12h claro-escuro, com livre acesso a ração (Purina) e água. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Controle (CT; sedentário), Excesso de exercício físico em declive (EE), Excesso de exercício físico em declive com administração crônica de rapamicina (EE/Rapa) e Endurance

(END). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esportes de Ribeirão Preto da USP (ID.2017.5.30.90.8).

### **3.2. Avaliação do desempenho físico**

Após duas semanas de adaptação, camundongos machos C57BL/6 com oito semanas de vida foram adaptados ao exercício em esteira rolante (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por cinco dias, por 10 min/dia, com velocidade inicial de 6m/min e incrementos de 3m/min por dia. A avaliação do desempenho físico ocorreu na semana 0 e 48h após a última sessão de treinamento dos protocolos EE, EE/Rapa e END nas semanas 4 e 8. Para as avaliações utilizou o teste de carga incremental e o teste de rotarod (61, 66-68). O grupo CT não foi submetido a nenhuma manipulação experimental para garantir que não houvesse interferência dos testes físicos nos parâmetros moleculares. A eficiência ou não dos protocolos de treinamento em aumentar o desempenho foi mensurada comparando seu estado inicial (ou seja, os resultados dos testes físicos antes de qualquer manipulação experimental) com seus dados após cada protocolo de exercício crônico. As Figuras 2A.1 e 2A.2 resumem o desenho experimental.

### **3.3. Teste de carga incremental (TCI)**

O teste de carga incremental iniciou com uma velocidade de 6 m/min com incrementos de 3 m/min a cada 3 min até a exaustão voluntária. A exaustão ocorre quando os animais tocam o final da esteira cinco vezes em um intervalo de 1 minuto. A potência máxima (Pmax), definida como a velocidade de exaustão do animal (m/min), foi utilizada para a prescrição das intensidades dos protocolos EE, EE/Rapa e END (69). Enquanto os grupos EE e EE/Rapa realizaram o TCI a 0% de inclinação na semana 0, e -14% de inclinação nas semanas 4 e 8, o grupo END realizou a 0% de inclinação em todas as avaliações.

### **3.4. Teste de rotarod**

Vinte e quatro horas após o TCI, a coordenação motora e o equilíbrio dos camundongos foram mensurados em um acelerador de estação única, o rotarod (INSIGHT®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Os camundongos foram colocados no rotarod configurado para uma velocidade inicial de 1rpm e final de 40rpm que foi alcançada 300s após o início do movimento. Os camundongos realizaram três tentativas, e o tempo médio que cada roedor foi capaz de permanecer no topo do rotarod foi registrado (61, 70).

### **3.5. Excesso de exercício físico em declive (EE)**

O protocolo de excesso de exercício físico de corrida em declive teve duração de 8 semanas, e cada semana experimental consistiu em cinco dias de treinamento e dois dias de descanso (68). Da semana 1 a semana 4, a intensidade do exercício foi realizada a 60% da P<sub>máx</sub> com 0% de inclinação, enquanto a duração do exercício iniciou em 15 min (semana 1) com incrementos de 15 min a cada semana. Na quinta semana, enquanto a intensidade e o volume do treinamento foram mantidos semelhantes aos da quarta semana, os camundongos correram a -14% da inclinação. Na sexta semana, a intensidade do treinamento aumentou para 70% da P<sub>máx</sub>. Na sétima semana, a intensidade e o volume do treinamento aumentaram para 75% da P<sub>máx</sub> e 75 min, respectivamente. Na oitava semana, o número de sessões diárias de treinamento aumentou de uma para duas com intervalo de descanso de quatro horas (Tabela 1). Para submeter os animais ao mesmo estresse do grupo EE/Rapa, nas últimas quatro semanas os animais receberam injeções de solução salina 1h antes de cada sessão de exercício.

**Tabela 1.** Protocolo de EE

Semana	Intensidade (%P <sub>max</sub> )	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação (%)	Intervalo entre as sessões (h)
1	60	15	1	0	24
2	60	30	1	0	24
3	60	45	1	0	24
4	60	60	1	0	24
5	60	60	1	-14	24
6	70	60	1	-14	24
7	75	75	1	-14	24
8	75	75	2	-14	4

### **3.6. Excesso de exercício físico em declive com injeções intraperitoneais de rapamicina (EE/Rapa)**

Durante a realização do protocolo de excesso de exercício físico de corrida em declive, o grupo EE/Rapa recebeu por via intraperitoneal uma solução contendo 2,4 mg/kg/peso de rapamicina (R8781- Sigma-Aldrich. Sigma-Aldrich Corporation. San Luis, Missouri, EUA) 1h antes de cada sessão de exercício nas últimas quatro semanas (71).

### **3.7. Protocolo de endurance (END)**

O protocolo de endurance teve duração de 8 semanas, e cada semana experimental consistiu em cinco dias de treinamento e dois dias de descanso (65). Da semana 1 a semana 4, a intensidade do exercício foi realizada a 60% da P<sub>máx</sub> com 0% de inclinação, enquanto a duração do exercício iniciou em 15 min (semana 1) com incrementos de 15 min a cada semana. Da semana 5 à semana 8, a intensidade foi mantida em 60% da P<sub>máx</sub> por 1 hora com 0% de inclinação (Tabela 2).

**Tabela 2.** Protocolo de END.

Semana	Intensidade (%Pmax)	Volume (min)	Sessões diárias	Inclinação (%)	Intervalo entre as sessões (h)
1	60	15	1	0	24
2	60	30	1	0	24
3	60	45	1	0	24
4	60	60	1	0	24
5-8	60	60	1	0	24

### 3.8. Níveis de glicose, coleta de sangue e extração do tecido hepático

Trinta e seis horas após as avaliações de desempenho físico, os camundongos, em jejum de 12h, tiveram o sangue da ponta da cauda coletado para mensuração da glicemia por meio de sistema de monitoramento glicêmico (modelo Accu-Chek™ Active, Roche, Santo André, São Paulo, Brasil). Em seguida, os roedores foram pesados em balança analítica (Toledo, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil) e, a seguir, anestesiados com injeções intraperitoneais de xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e cetamina (ou quetamina) (100 mg/kg de peso corporal) misturado na mesma seringa. Assim que o efeito da anestesia foi confirmado pela perda dos reflexos pedal e corneano, o sangue total foi coletado por decapitação. O soro foi separado por centrifugação ( $1100 \times g$ ) por 15 min a  $4^\circ C$  e armazenado a  $-80^\circ C$  para posterior determinação da insulina, cortisol, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, testosterona e tiroxina (T4). Imediatamente após a coleta do sangue, o fígado foi removido, pesado e preparado para histologia (n=5 camundongos para cada grupo experimental), imunohistoquímica (n=5 camundongos para cada grupo experimental), conteúdo de gordura hepática (n=5 camundongos para cada grupo experimental), reação em cadeia da polimerase em tempo real (RTq-PCR; n=5 camundongos para cada grupo experimental) e técnica de *immunoblotting* (n=5 camundongos para cada grupo experimental).

### 3.9. Análises séricas

A insulina sérica foi mensurada por kit ELISA (Crystal Chem, Elk Grove Village, IL USA) seguindo as instruções do fabricante. A resistência à insulina (HOMA-IR), a função das células  $\beta$  (HOMA-% B) e a sensibilidade à insulina (HOMA-% S) foram mensuradas usando a calculadora online no Diabetes Trials Unit da Universidade de Oxford (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>). Para determinar a AST, ALT, colesterol total e triglicerídeos, kits de teste convencionais disponíveis comercialmente do LaborLab foram utilizados (LaborLab, Guarulhos, São Paulo, Brasil). De acordo com as instruções do fabricante (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA), cortisol, testosterona e T4 foram avaliados usando reagentes multiplex Luminex™ (MSHMAG-21K-05 - Merck Millipore).

As amostras foram coletadas no instrumento Luminex MAP200 e analisadas usando o 3.1 xPONENT System.

### **3.10. Histologia**

Os tecidos hepáticos de todos os animais experimentais foram fixados em formaldeído a 10% dissolvido em solução salina tampão de fosfato (0,1 M pH 7,3) por 24 h. As amostras foram desidratadas em uma série graduada de etanol, depuradas em xilol e incluídas em Paraplast (Sigma Co, Saint Louis, MO, EUA). Para avaliação histopatológica, lâminas de 5 µm foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) para análise do glicogênio. As análises foram realizadas no microscópio digital Axiophot II Zeiss Microscope (One Zeiss Drive, Thornwood, NY, USA). As imagens foram adquiridas com resolução de 40x. A intensidade da coloração do glicogênio foi examinada em 10 campos por animal usando o software Image-J versão 1.50i (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), e o limite de cor foi definido para identificar o glicogênio, sendo esse convertido para uma imagem em preto/branco e definida como binária para escopo de medição e intensidade da coloração de glicogênio. O glicogênio foi relatado como porcentagem da área marcada pela coloração na imagem binária, que foi comparada com a área total da imagem.

### **3.11. Marcação por Oil-red**

O fígado foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido para confirmar a infiltração de lipídios usando coloração com Oil-red (n=5) (ab150678 Lipid Stain - ABCAM, Cambridge, Reino Unido). Seções seriais a 7 µm foram cortadas em lâminas de microscópio carregadas positivamente no criostato CM1850 (Leica, Wetzlar, Alemanha). As lâminas foram incubadas em propilenoglicol para detectar a coloração de Oil-red. As lâminas foram lavadas, contrastadas com hematoxilina e montadas com um meio de montagem aquoso na sequência.

A área de depósitos de lipídios no tecido total (expressa em porcentagem) foi determinada para avaliar a deposição de gordura. Foram selecionadas dez imagens de tecido hepático com coloração Oil-red de cada grupo experimental. A porcentagem de marcação de tecido foi quantificada para cada imagem (72) usando o software Image-J (versão 1.50i). A esteatose hepática foi avaliada pelo método de contagem de pontos. Foram realizadas cinco lâminas de coloração Oil-red (por amostra). Dez campos microscópicos foram selecionados aleatoriamente para estimar a densidade de volume (Vv) da esteatose hepática pelos métodos de contagem de 36 pontos. Para avaliar o tamanho dos hepatócitos, usamos dez campos selecionados aleatoriamente, que foram contados com aumento de 400x para determinar o número de células dos hepatócitos. Os resultados foram apresentados como números de células por campo.

### 3.12. Imunohistoquímica

A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão (Electrolux Chef), e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3% diluído em metanol por 15 minutos. Posteriormente, o tecido foi bloqueado com albumina de soro bovino a 3% (BSA) da Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Missouri, EUA), diluído em TBS-T (1% Triton X - 100, 100 mM de Tris, pH 7,4), por uma hora e incubados com anticorpos primários policlonais para Sqstm1/p62 e LC3B (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EUA) diluídos em 1% BSA durante a noite (12 horas). No dia seguinte, os cortes foram incubados com anticorpo secundário *goat anti-rabbit HRP* (1:200 -sc-2030; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) diluído em BSA 1% por duas horas. As secções hepáticas de cada grupo experimental foram avaliadas através do precipitado acastanhado de diaminobenzidina e posteriormente corado com hematoxilina. Para todos os marcadores, controles positivos e negativos foram realizados (73).

As amostras de fígado foram adquiridas usando microscópio digital Axiophot II Zeiss Microscope (One Zeiss Drive, Thornwood, NY, EUA) com resolução de 40x, a intensidade de imunorreatividade do antígeno Sqstm1/p62 e LC3B foi examinada em 10 campos por animal usando o software Image-J versão 1.50 i (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), e a porcentagem de marcação de tecido foi quantificada para cada imagem.

### 3.13. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RTq-PCR)

O RNA total do fígado foi extraído utilizando trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). De acordo com as instruções do fabricante, o cDNA foi sintetizado com 1000 ng de RNA total usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). A PCR quantitativa em tempo real foi realizada no *ViiA7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) para analisar a expressão relativa do RNAm dos genes descritos na Tabela 3. O reagente *5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR SuperMix* da Solis BioDyne (Tartu, Estonia) foi utilizado seguindo as especificações do fabricante. Os ciclos para esses PCRs foram os seguintes: um ciclo a 12 °C por 12 min, 40 ciclos a 15 s por 95 °C, 25 s a 60 °C, e 25s a 72 °C. A curva de *melting* foi realizada logo em seguida. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) foi utilizado como gene de referência para a normalização dos dados. Cada ensaio de PCR foi realizado em duplicado. A quantificação relativa foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  usando o *Thermo Fisher Cloud Software*, RQ versão 3.7 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

**Table 3.** Desenho dos primers.

Gene	Forward	Reverse
<i>Prkaa1</i>	CCAGGTCATCAGTACACCATCT	TTTCCTTTTCGTCCAACCTTCC
<i>Mtor</i>	CCACGTGGTTAGCCAGACT	TAGCGGATATCAGGGTCAGGA
<i>Foxo1</i>	AGCTTCCCACACAGTGTCAA	AGGACTTTTAAATGTAGCCTGCTC
<i>Foxo3</i>	CAAAGCAGACCCTCAAACCTGAC	CTGTAAACGGATCACTGTCCAC
<i>Ulk1</i>	AACATCCGAGTCAAGATTGCTG	ATAATGACCTCAGGAGCCATGT
<i>Becn1</i>	AGGAACTCACAGCTCCATTACT	CTCTCCTGAGTTAGCCTCTTCC
<i>Atg5</i>	GCTTTTGCCAAGAGTCAGCTAT	AACCAATTGGATAATGCCATTTTCCAG
<i>Map1lc3b</i>	AGATAATCAGACGGCGCTTG	TCGTACACTTCGGAGATGGG
<i>Sqstm1</i>	ACAGCCAGAGGAACAGATGG	GTAGAGACTGGAGTTCACCTGTA
<i>Bnip3</i>	CAGCATGAGAAACACAAGCG	TCCAATGTAGATCCCCAAGCC
<i>Srebf1</i>	GAGCCATGGATTGCACATTT	GGGAAGTCACTGTCTTGGTTG
<i>Fasn</i>	GTGAGGTTGCTGTCGTCTGT	GAGGACACTCAAGTGGCTGA
<i>Ppargc1a</i>	GAGTTGAAAAGCTTGACTGGC	CAGCACACTCTATGTCACTCCA
<i>Ppard</i>	CCGCATGAAGCTCGAGTATG	CCAAAGCGGATAGCGTTGT
<i>Acacb</i>	ACCTGAAGACCTTAAAGCCAATG	CCAGCCCACACTGCTTGT
<i>Gapdh</i>	AAGAGGGATGCTGCCCTTAC	CGGGACGAGGAAACACTCTC

*Prkaa1*: proteína quinase, ativada por AMP, subunidade catalítica alfa 1; *Mtor*: alvo mecânico da rapamicina; *Foxo1*: O1 da caixa forkhead; *Foxo3*: O3 da caixa forkhead; *Ulk1*: cinase 1 de ativação da autofagia; *Becn1*: beclin 1; *Atg5*: 5 relacionado a autofagia; *Map1lc3b*: cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos; *Sqstm1*: sequestossomo 1; *Bnip3*: proteína 3 que interage com a proteína BCL2/adenovírus E1B 19 kDa; *Srebf1*: fator de transcrição de ligação do elemento regulador de colesterol 1; *Fasn*: ácido graxo sintase; *Ppargc1a*: receptor ativado proliferativo de peroxissoma, gama, coativador 1 alfa; *Ppard*: receptor ativado proliferativo de peroxissoma, delta; *Acacb*: acetil-coenzima A carboxilase beta; *Gapdh*: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

### 3.14. Técnica de immunoblotting

A técnica de *immunoblotting* foi realizada conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (66, 67, 70). Os anticorpos utilizados foram: proteína quinase ativada por AMP (Ampk; SC-74461), O3A da caixa forkhead (*Foxo3A*; SC-48348), Proteína ribossomal S6 quinase beta-1 (p70S6K; SC-230), cinase 1 de ativação da autofagia (ULK1; SC-390908) da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Dallas, Texas, EUA); Acetil-CoA carboxilase (ACC; 3676S), Beta-actina (Beta-actin; 4967S), O1A da caixa forkhead (*Foxo1A*;

9454S), cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (LC3B; 3868S), alvo mecânico da rapamicina (mTOR; 2972S), fosforilação da ACC (p-ACC; Ser79; 3661S), fosforilação da AMPK (p-AMPK; Thr172; 2535S), fosforilação da Foxo3A (p-Foxo3A; Ser253; 13129S), fosforilação da p70S6K (p-p70S6K; Thr389; 9206S), fosforilação da mTOR (p-mTOR; Ser2448; 2971S), sequestossomo 1 (p62; 23214S), esteroil-CoA dessaturase 1 (SCD1; 2283S) da Cell Signaling Technology (Cell Signalling Technology, Danvers, Massachusetts, USA); fosforilação da Foxo1A (p-Foxo1A; Ser256; OAAJ02704), fosforilação da ULK1 (p-ULK1; Ser556; OABF01248) da Aviva (Aviva Systems Biology Corporation, San Diego, California, USA). Os reagentes químicos de rotina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, Missouri, EUA). A escolha das proteínas autofágicas foi baseada no “*Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)*” (74).

### 3.15. Fluxo autofágico

Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício físico, cinco camundongos de cada grupo experimental foram tratados com injeções intraperitoneais de colchicina (0,4 mg/kg/dia; AB120663, Abcam, Cambridge, Reino Unido) por três dias consecutivos (75, 76). Três camundongos do grupo controle foram tratados com veículo (solução salina) para demonstrar a eficácia da droga. O tratamento com colchicina bloqueia a degradação do autofagossomo, induzindo um aumento nos níveis de LC3 II e/ou Sqstm1/p62 (77). Uma hora após a última injeção de colchicina ou administração de veículo, os animais foram anestesiados por uma administração intraperitoneal de xilazina (10 mg/kg de peso corporal) e cetamina (100 mg/kg de peso corporal). Assim que o efeito da anestesia foi confirmado pela perda dos reflexos pedal e corneano, as amostras de fígado foram removidas, lavadas com solução salina e utilizadas para a medição dos níveis da proteína de LC3 II (a forma ativa/lipidada de LC3-I) e Sqstm1/p62 (proteína adaptadora de autofagossomo) pela técnica de *immunoblotting*. A apresentação esquemática do tratamento com colchicina está demonstrado nas Figuras 2A.3 e 2A.4. Além disso, foi utilizado um grupo específico de camundongos para este experimento.

### 3.16. Análise estatística

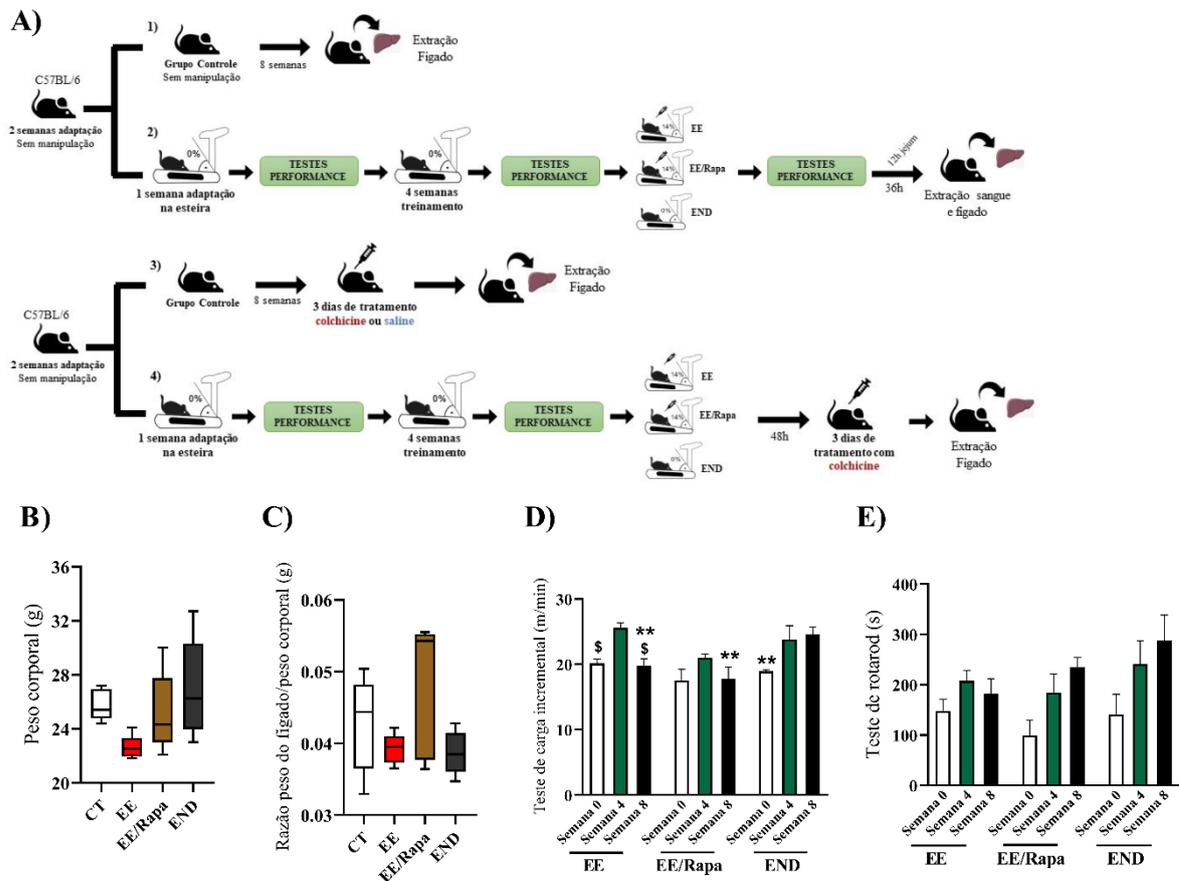
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (SE) da média. Os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene* foram utilizados para verificar a normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas (distribuição normal) ou teste de *Friedman* (distribuição não normal) foi utilizada para verificar os efeitos de protocolos experimentais crônicos nos testes de desempenho. Para outros parâmetros, ANOVA de uma via (distribuição normal) ou o teste de *Kruskal Wallis* foram utilizados para verificar o impacto de protocolos experimentais crônicos.

Quando a ANOVA para medições repetidas ou ANOVA de uma via indicou significância estatística, o teste *post-hoc* de *Bonferroni* foi usado. Para *Kruskal Wallis*, foi utilizado o teste *post-hoc Games-Howell*. Todas as análises foram bilaterais e o nível de significância foi estabelecido em  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 8 para Windows (GraphPad Software, Inc).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. O exercício excessivo diminuiu o desempenho na semana 8**

O peso corporal (Figura 2B) e a razão do fígado/peso corporal (Figura 2C) não foram diferentes entre os grupos experimentais. Para o teste de carga incremental (Figura 2D) o grupo EE apresentou menores valores na semana 0 ( $p=0,022$ ) e semana 8 ( $p=0,047$ ) comparado com a semana 4. O grupo EE/Rapa não apresentou diferença entre as semanas experimentais. O grupo END apresentou valores mais elevados na semana 8 em comparação com a semana 0. Em comparação com o grupo END na semana 8, os grupos EE e EE/Rapa tiveram desempenho inferior na mesma semana experimental ( $p=0,000$ ;  $p=0,002$ , respectivamente). Para o teste do rotarod (Figura 2E), não foram observadas diferenças entre as semanas experimentais e os grupos.



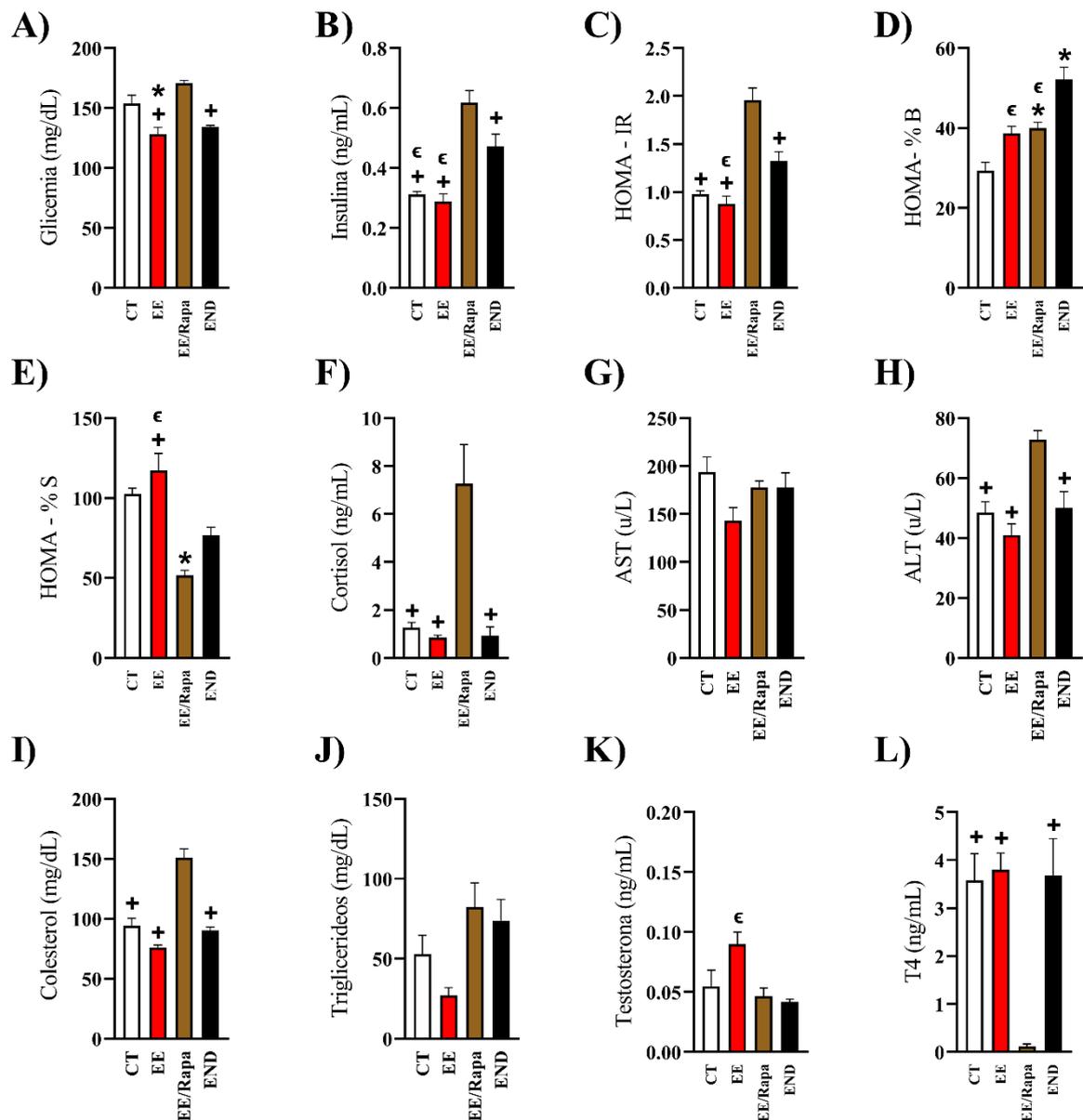
**Figura 2.** Representação esquemática dos procedimentos experimentais (A). Peso corporal (B). Relação peso do fígado/peso corporal (C). Teste de carga incremental (D). Teste de Rotarod (E). Os dados correspondem à média±SE de n=5 camundongos/grupo. \*p≤0.05 vs. CT; +p≤0.05 vs. EE/Rapa; \$p≤0.05 vs. EE semana 4; \*\*p≤0.05 vs. END semana 8. Controle (CT; sedentário), Excesso de exercício físico em declive (EE), Excesso de exercício físico em declive com administração crônica de rapamicina (EE/Rapa) e Endurance (END).

#### 4.2. O exercício excessivo combinado com o tratamento com rapamicina aumentou a glicemia, insulina, HOMA-IR, cortisol, ALT e colesterol, mas reduziu os níveis de T4

A glicemia antes do sacrifício foi menor para os grupos EE (p=0,000) e END (p=0,000) em relação ao grupo EE/Rapa (Figura 3A). O grupo EE também apresentou valores de glicemia mais baixos em comparação ao grupo CT (p=0,008). Os níveis de insulina foram menores para os grupos CT (p=0,000), EE (p=0,000) e END (p=0,034) em comparação com o grupo EE/Rapa (Figura 3B). Os níveis de insulina foram menores para os grupos CT (p=0,012) e EE (p=0,007) em relação ao grupo END (Figura 3B). O HOMA-IR foi menor para os grupos CT (p=0,000), EE (p=0,009) e END (p=0,012) em comparação ao grupo EE/Rapa (Figura 3C). Os níveis de HOMA-IR foram menores para o grupo EE (p=0,009) do que para o grupo END (Figura 3C). O HOMA-% B foi maior para os grupos EE/Rapa (p=0,003) e END (p=0,000) em relação ao

grupo CT (Figura 3D). O HOMA-% B foi menor para os grupos EE ( $p=0,006$ ) e EE/Rapa ( $p=0,014$ ) em relação ao grupo END (Figura 3D). O HOMA-% S foi menor para o grupo EE/Rapa ( $p=0,003$ ) em comparação ao grupo CT (Figura 3E). O HOMA-% S foi maior para o grupo EE em relação aos grupos EE/Rapa ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,001$ ) (Figura 3E).

Os níveis de cortisol foram menores para os grupos CT ( $p=0,000$ ), EE ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,000$ ) em comparação com o grupo EE/Rapa (Figura 3F). O AST e os triglicérides não foram diferentes entre os grupos experimentais (Figuras 3G e 3J). Os níveis de ALT foram menores para os grupos CT ( $p=0,004$ ), EE ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,012$ ) em comparação com o grupo EE/Rapa (Figura 3H). Além disso, os níveis de colesterol foram menores para os grupos CT ( $p=0,000$ ), EE ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,000$ ) em comparação com o grupo EE/Rapa (Figura 3I). O nível de testosterona foi maior para o grupo EE ( $p=0,014$ ) do que para o grupo END (Figura 3K). O hormônio T4 foi maior para os grupos CT ( $p=0,003$ ), EE ( $p=0,003$ ) e END ( $p=0,006$ ) em comparação com o grupo EE/Rapa (Figura 3L).

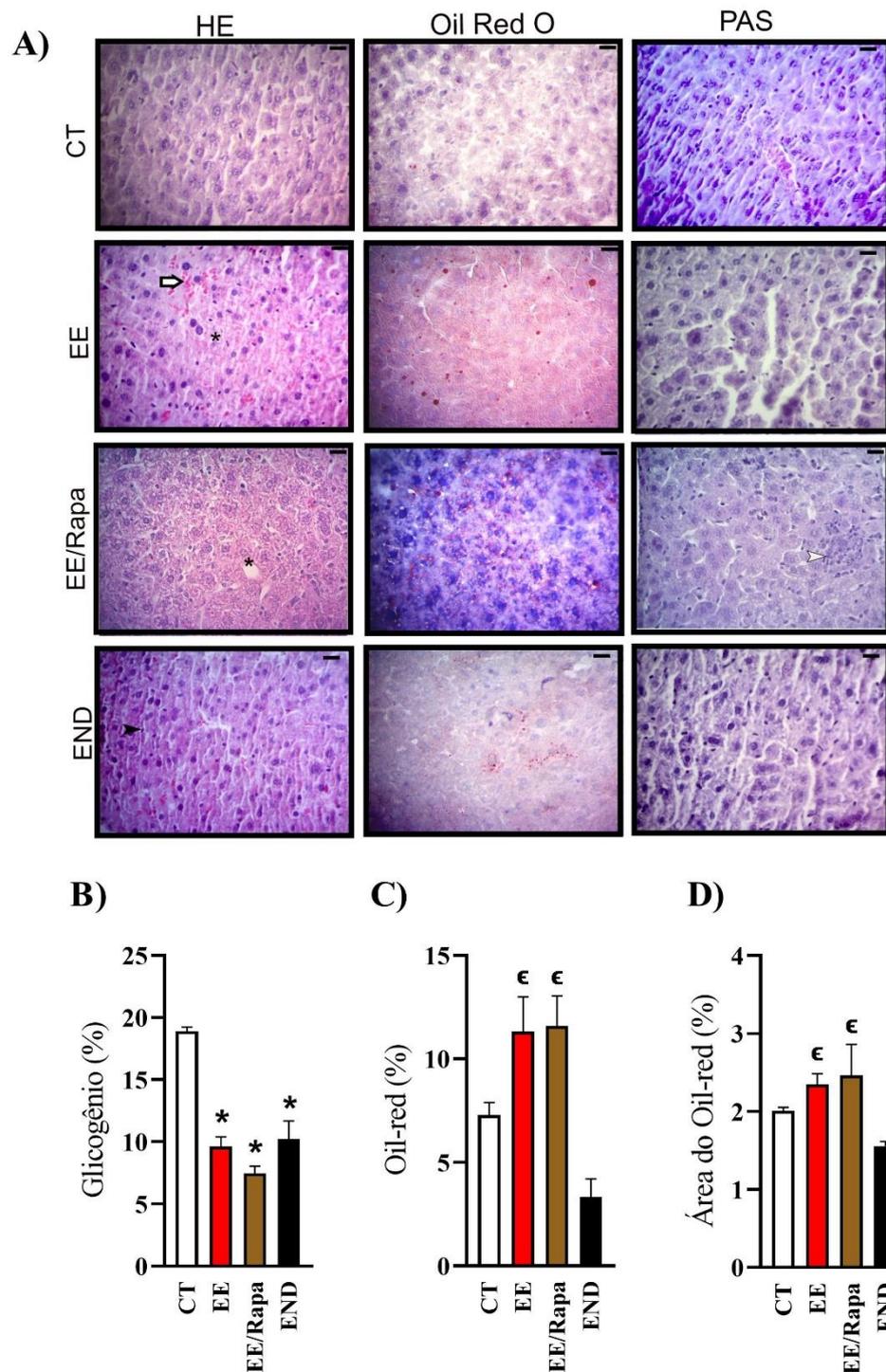


**Figura 3.** Níveis séricos de glicemia (A), insulina (B), HOMA-IR (C), HOMA-%B (D), HOMA-%S (E), cortisol (F), AST (G), ALT (H), colesterol (I), triglicérides (J), testosterona (K), e T4 (L). Os dados correspondem à média±SE de n=5 camundongos/grupo. \*p<0.05 vs. CT; +p<0.05 vs. EE/Rapa; €p<0.05 vs. END. Controle (CT; sedentário), Excesso de exercício físico em declive (EE), Excesso de exercício físico em declive com administração crônica de rapamicina (EE/Rapa) e Endurance (END).

#### 4.3. Apesar do tratamento com rapamicina, o exercício excessivo aumentou o teor de gordura hepática

A Figura 4A mostra o HE representativo do tecido hepático de um camundongo de cada grupo experimental. O grupo CT mostrou hepatócitos e trato portal com características morfológicas regulares. Os grupos EE e EE/Rapa apresentaram hepatócitos com vacúolos citoplasmáticos. O grupo EE apresentou em todas as amostras analisadas hiperemia, indicando

aumento local do volume sanguíneo. No grupo END, discernimos alterações relacionadas à maior presença de células de Kupffer quando comparado ao grupo CT. O glicogênio foi menor para os grupos EE ( $p=0,000$ ), EE/Rapa ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,000$ ) em relação ao grupo CT (Figura 4B). O teor de gordura hepática foi maior para os grupos EE ( $p=0,001$ ) e EE/Rapa ( $p=0,001$ ) em relação ao grupo END (Figura 4C e 4D).

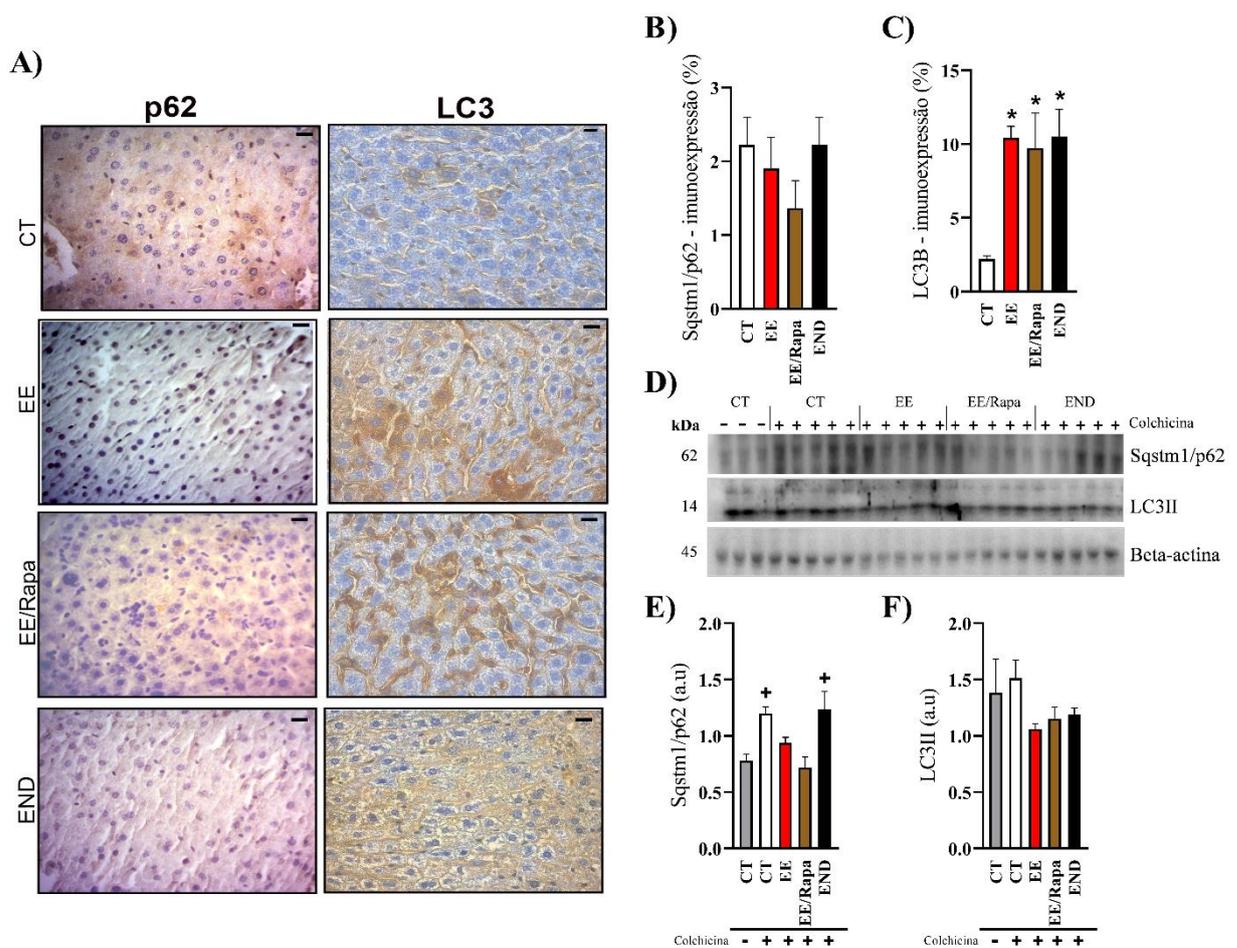


**Figura 4.** Caracterização histológica (x400) dos hepatócitos por hematoxilina e eosina (HE), Oil-red, e ácido periodico Schiff (PAS). Bar=20 $\mu$ m. (A), Glicogênio (B), Oil-red (C), Área do Oil-red (D). Os dados correspondem

à média±SE de n=5 camundongos/grupo. \* $p \leq 0.05$  vs. CT; † $p \leq 0.05$  vs. END. Controle (CT; sedentário), Excesso de exercício físico em declive (EE), Excesso de exercício físico em declive com administração crônica de rapamicina (EE/Rapa) e Endurance (END).

#### 4.4. Todos os grupos de exercício aumentaram a imunoposição de LC3B, mas apenas a combinação de exercício excessivo e rapamicina reduziu os níveis de Sqstm1/p62 após o tratamento com colchicina

A imunoposição de Sqstm1/p62 (%) não foi diferente entre os grupos (Figura 5B). A imunoposição da LC3B (%) foi maior para os grupos EE ( $p=0,020$ ), EE/Rapa ( $p=0,034$ ) e END ( $p=0,019$ ) grupos em comparação com o grupo CT (Figura 5C). Para o fluxo autofágico, o grupo CT que recebeu solução salina (veículo) apresentou menor conteúdo das proteínas Sqstm1/p62 e LC3 II do que o grupo CT que recebeu colchicina. Para os grupos exercitados que receberam colchicina, Sqstm1/p62 foi maior para os grupos CT ( $p=0,011$ ) e END ( $p=0,009$ ) em relação ao grupo EE/Rapa (Figura 5E). O conteúdo da LC3II não foi diferente entre os grupos (Figura 5F).



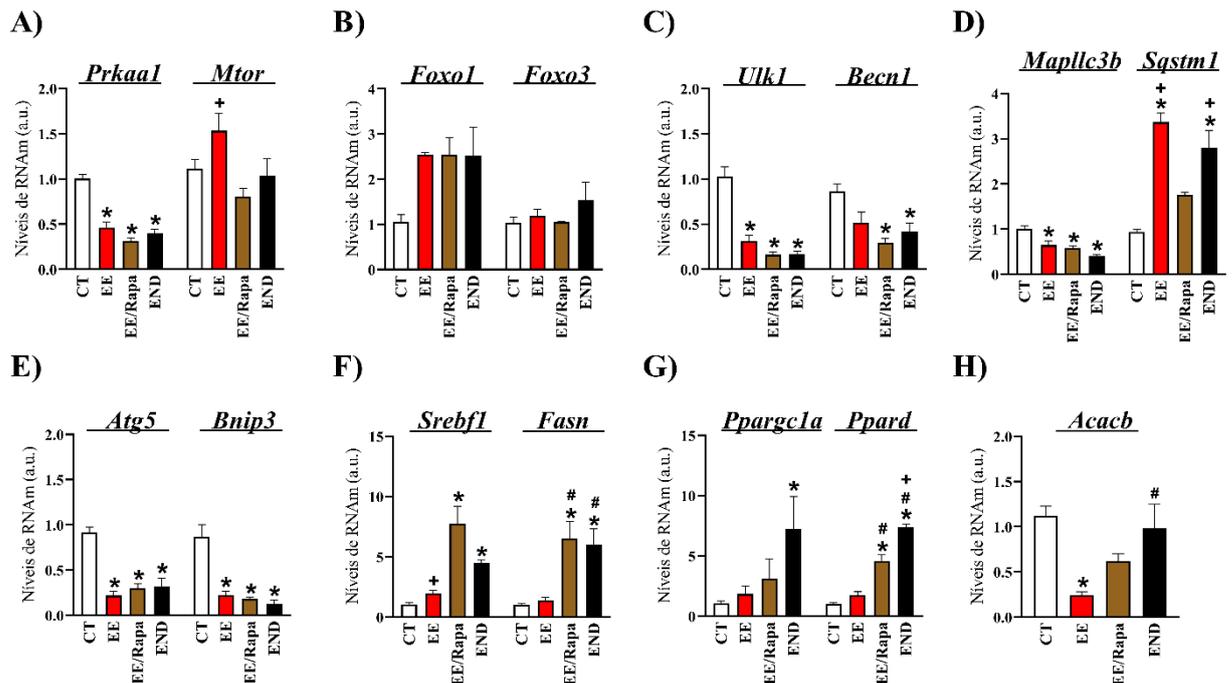
**Figure 5.** Caracterização imunohistoquímica (x400) de hepatócitos por Sqstm1/p62 e LC3B (A), imunoposição da Sqstm1/p62 (B), imunoposição da LC3B (C), bandas com kDa (D), níveis proteicos de Sqstm1/p62 (E) e

LC3 II (F). Os dados correspondem à média±SE de n=5 camundongos/grupo. \* $p \leq 0.05$  vs. CT; † $p \leq 0.05$  vs. EE/Rapa. Controle (CT; sedentário), Excesso de exercício físico em declive (EE), Excesso de exercício físico em declive com administração crônica de rapamicina (EE/Rapa) e Endurance (END).

#### 4.5. Todos os grupos de exercício reduziram a expressão de genes da via da autofagia

Os níveis de RNAm de *Prkaa1* foram menores para os grupos EE ( $p=0,000$ ), EE/Rapa ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,000$ ) em comparação com o grupo CT (Figura 6A). Os níveis de RNAm da *Mtor* foram maiores para o grupo EE ( $p=0,039$ ) em comparação com o grupo EE/Rapa (Figura 6A). Os níveis de RNAm de *Foxo1* e *Foxo3* não foram diferentes entre os grupos experimentais (Figura 6B). Os níveis de RNAm da *Ulk1* foram menores para os grupos EE ( $p=0,000$ ), EE/Rapa ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,000$ ) em comparação com o grupo CT (Figura 6C). Os níveis de RNAm da *Becn1* foram menores para EE/Rapa ( $p=0,004$ ) e END ( $p=0,029$ ) em comparação com o grupo CT (Figura 6C). Os níveis de RNAm *Map1lc3a* foram menores para os grupos EE ( $p=0,005$ ), EE/Rapa ( $p=0,002$ ) e END ( $p=0,000$ ) em comparação com o grupo CT (Figura 6D).

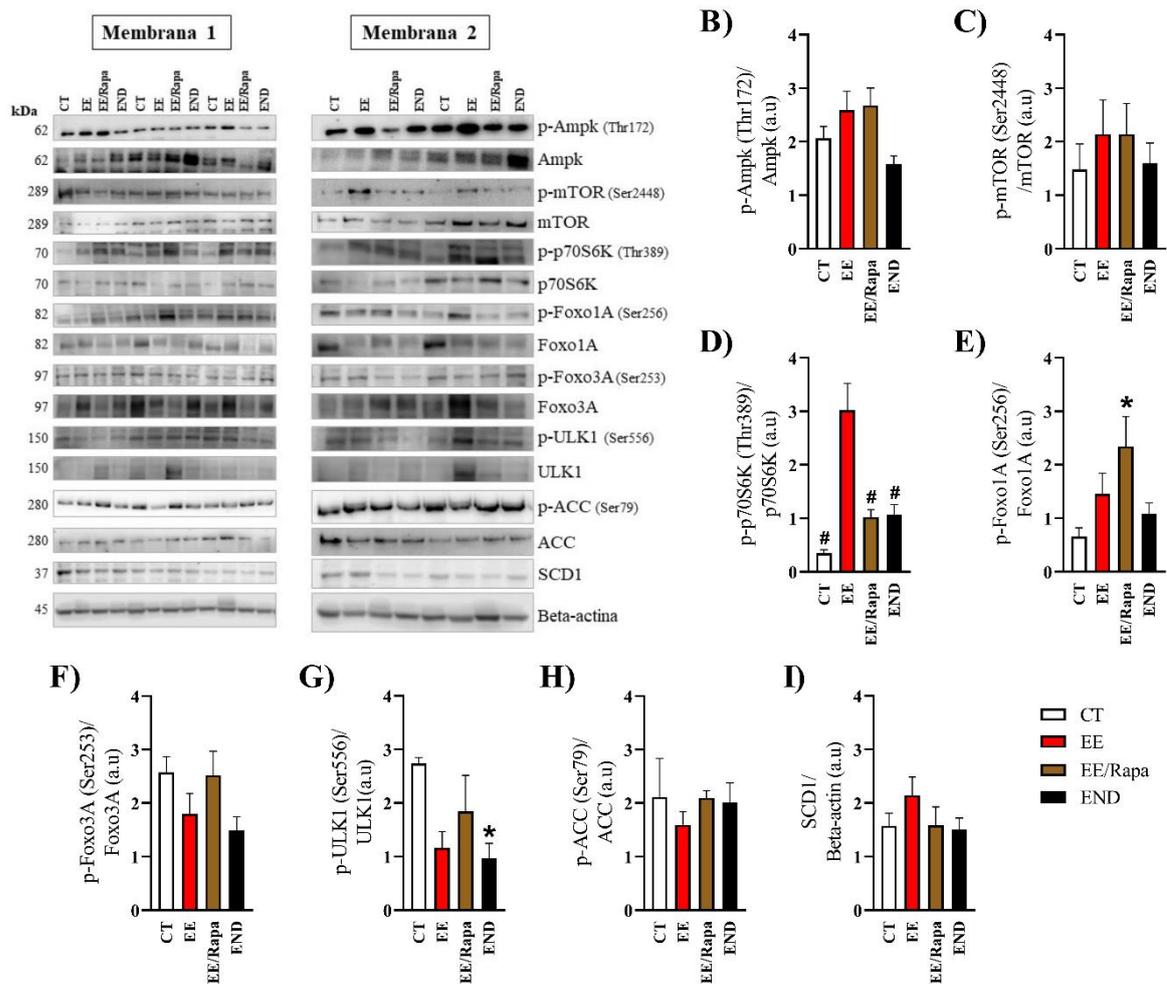
Os níveis de RNAm da *Sqstm1* foram maiores para os grupos EE ( $p=0,000$  e  $p=0,001$ ) e END ( $p=0,000$  e  $p=0,035$ ) do que os grupos CT e EE/Rapa (Figura 6D). Os níveis de RNAm da *Atg5* e *Bnip3* foram menores para os grupos EE ( $p=0,000$ ), EE/Rapa ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,000$ ) em comparação com o grupo CT (Figura 6E). Os níveis de RNAm de *Srebfl* foram maiores para os grupos EE/Rapa ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,049$ ) em comparação com o grupo CT (Figura 6F). Os níveis de RNAm de *Srebfl* foram menores para o grupo EE ( $p=0,000$ ) em comparação com o grupo EE/Rapa (Figura 6F). Os níveis de RNAm de *Fasn* foram maiores para os grupos EE/Rapa ( $p=0,004$  e  $p=0,011$ ) e END ( $p=0,009$  e  $p=0,024$ ) em comparação com os grupos CT e EE (Figura 6F). Os níveis de RNAm de *Ppargc1a* foram maiores no grupo END ( $p=0,030$ ) do que no grupo CT (Figura 5G). Os níveis de RNAm de *Ppard* foram maiores para os grupos EE/Rapa ( $p=0,000$ ) e END ( $p=0,000$ ) em comparação com os grupos CT e EE (Figura 6G). Os níveis de RNAm de *Ppard* foram maiores para o grupo END ( $p=0,000$ ) em comparação com o grupo EE/Rapa (Figura 6G). Os níveis de RNAm do *Acacb* foram menores para o grupo EE ( $p=0,008$ ) em comparação ao grupo CT, e o grupo END ( $p=0,027$ ) apresentou níveis mais elevados em comparação ao grupo EE (Figura 6H).



**Figure 6.** Níveis de RNAm de *Prkaa1* e *Mtor* (A); *Foxo1* e *Foxo3* (B); *Ulk1* e *Becn1* (C); *Maplc3b* e *Sqstm1* (D); *Atg5* e *Bnip3* (E); *Srebfl* e *Fasn* (F); *Ppargc1a* e *Ppard* (G); e *Acacb* (H). Os dados correspondem à média±SE de n=5 camundongos/grupo. \* $p \leq 0.05$  vs. CT; # $p \leq 0.05$  vs. EE; + $p \leq 0.05$  vs. EE/Rapa;  $\dagger p \leq 0.05$  vs. END. Controle (CT; sedentário), Excesso de exercício físico em declive (EE), Excesso de exercício físico em declive com administração crônica de rapamicina (EE/Rapa) e Endurance (END).

#### 4.6. O exercício excessivo combinado com o tratamento com rapamicina inibiu a fosforilação de p70S6K e aumentou a fosforilação de Foxo1A

Os conteúdos de p-Ampk/Ampk e p-mTOR/mTOR não foram diferentes entre os grupos experimentais (Figura 7B e 7C). O conteúdo de p-p70S6K/p70S6K foi menor para os grupos CT ( $p=0,000$ ), EE/Rapa ( $p=0,001$ ) e END ( $p=0,002$ ) em comparação com o grupo EE (Figura 7D). O conteúdo de p-Foxo1A/Foxo1A foi maior para o grupo EE/Rapa ( $p=0,047$ ) do que o grupo CT (Figura 7E). O conteúdo de p-Foxo3A/Foxo3A não foi diferente entre os grupos experimentais (Figura 7F). O conteúdo de p-ULK1/ULK1 foi menor para o grupo END ( $p=0,032$ ) do que para o grupo CT (Figura 7G). Os conteúdos de p-ACC/ACC e SCD1 não foram diferentes entre os grupos experimentais (Figura 7H e 7I).



**Figure 7.** Membranas de cada experimento com respectivos kDa (A); Conteúdo proteico de p-Ampk (Thr172)/Ampk (B); p-mTOR (Ser2448)/mTOR (C); p-p70S6K (Thr389)/p70S6K (D); p-Foxo1A (Ser256)/Foxo1A (E); p-Foxo3A (Ser253)/Foxo3A (F); p-ULK1 (Ser556)/ULK1 (G); p-ACC (Ser79)/ACC (H); SCD1/Beta-actina (I). Os dados correspondem à média±SE de n=5 camundongos/grupo. \*p<0.05 vs. CT; #p<0.05 vs. EE; +p<0.05 vs. EE/Rapa. Controle (CT; sedentário), Excesso de exercício físico em declive (EE), Excesso de exercício físico em declive com administração crônica de rapamicina (EE/Rapa) e Endurance (END). A beta-actina de cada membrana está disponível no arquivo suplementar 1. Como duas membranas foram utilizadas para cada proteína, a comparação dos diferentes géis é permitida pela aplicação de um método de calibração publicado anteriormente (78).

## 5. DISCUSSÃO

Os principais achados da presente investigação foram: a) o grupo EE/Rapa apresentou níveis mais elevados de glicose, insulina, HOMA-IR, cortisol, ALT, colesterol, mas níveis mais baixos de T4; b) os grupos EE e EE/Rapa aumentaram o conteúdo de gordura hepática; c) os grupos EE, EE/Rapa e END apresentaram maior imunopositividade de LC3, mas apenas o EE/Rapa diminuiu os níveis de Sqstm1/p62 após o tratamento com colchicina; d) os grupos EE,

EE/Rapa e END diminuíram a expressão dos genes da via da autofagia; e) os níveis de RNAm de *Mtor* e *Sqstm1*, e o conteúdo de proteína de p-p70S6K/p70S6K foram maiores para o grupo EE em comparação com o grupo EE/Rapa; f) os níveis de RNAm de *Fasn*, *Ppard* e *Srebfl* foram maiores para os grupos EE/Rapa e END em comparação ao grupo CT. Em resumo, a rapamicina inibiu a via mTOR, destacada pela expressão diminuída de *Mtor* e p-p70S6K/p70S6K, mas não foi capaz de regular positivamente os marcadores de autofagia e evitar o acúmulo de gordura no fígado.

Embora as adaptações de desempenho dos grupos EE e END tenham sido descritas anteriormente (70, 79, 80), esta é a primeira vez que a combinação de exercício excessivo e rapamicina foi analisada. Interessantemente, na semana 8, o grupo EE/Rapa não apresentou queda de performance no TCI comparado com a semana 4, como observado para o grupo EE. A redução da sinalização da mTOR melhora a respiração mitocondrial, aumentando a tradução da subunidade do complexo de fosforilação oxidativa codificada pelo DNAm, e modulando a produção de ROS (81), o que poderia justificar a resposta do grupo EE/Rapa no TCI. Para o teste de rotarod, a tendência ( $p=0,063$ ) de melhora para o grupo EE/Rapa, demonstrada em outros estudos usando a mesma avaliação (82, 83), pode estar associada aos efeitos neuroprotetores induzidos pela rapamicina, incluindo estimulação da autofagia e inibição da tradução de proteínas (83). A rapamicina também pode prevenir a perda de neurônios dopaminérgicos e déficits motores (84).

O grupo EE apresentou menores níveis séricos de glicose e insulina, enquanto o grupo EE/Rapa teve altos níveis de glicose e insulina. Um estudo anterior demonstrou níveis mais baixos de glicose para camundongos submetidos ao protocolo de EE, mas nenhuma diferença nos níveis de insulina (61). O HOMA-IR, índice de resistência à insulina, foi maior para o grupo EE/Rapa. Conseqüentemente, a sensibilidade à insulina (HOMA-% S) foi menor para o mesmo grupo. Os resultados foram opostos para o grupo EE, porém a porcentagem da função das células beta (HOMA-% B) foi menor para os grupos EE e EE/Rapa do que para o grupo END. Esses achados sugerem que o grupo EE possui menor função das células beta, o que foi compensado pela maior produção e sensibilidade a insulina. No entanto, quando combinado com a administração de rapamicina, desenvolveu-se uma condição de resistência à insulina, levando à diminuição da sensibilidade à insulina.

Estudos recentes demonstraram que o tratamento crônico com rapamicina prejudicou vários parâmetros do metabolismo de carboidratos, levando a intolerância à glicose e resistência à insulina (85-87). A administração crônica de rapamicina levou a hiperlipidemia e desregulação do metabolismo lipídico (88). Quando a resistência à insulina é desenvolvida, a

insulina perde a capacidade de inibir a gliconeogênese hepática, mas ainda pode aumentar a lipogênese. Como resultado, ocorrem hiperglicemia e hipertrigliceridemia (89, 90). Portanto, os níveis elevados de insulina para o grupo EE/Rapa podem explicar os níveis mais elevados de glicose e colesterol neste grupo. O grupo EE/Rapa aumentou os níveis de cortisol e diminuiu os níveis de T4. Esses achados podem ser justificados pela supressão da mTOR, uma vez que o tratamento com cortisol diminuiu a fosforilação de S6K (91), enquanto o tratamento com T4 aumentou a expressão da proteína ribossomal S6 (92), ambos alvos da via da mTOR. Os níveis elevados de testosterona sérica dependem do volume, intensidade e massa muscular envolvida no exercício (93). Assim, os valores aumentados de testosterona no grupo EE podem estar relacionados com a intensidade e o volume do exercício. Ao mesmo tempo, os níveis mais baixos do grupo EE/Rapa podem estar ligados ao aumento do cortisol, que suprime o hormônio luteinizante testicular e diminui a testosterona (93).

Os grupos EE e EE/Rapa apresentaram acúmulo de gordura hepática. O aumento de lipídios nos hepatócitos caracteriza a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), gerando fatores patogênicos, como dano oxidativo ao DNA, inflamação e outros (94). Além disso, camundongos submetidos ao protocolo de exercício excessivo apresentaram transdução prejudicada da via de sinalização da insulina no músculo esquelético (95). A resistência à insulina do músculo esquelético pode causar o desenvolvimento de NAFLD, aumentando a lipogênese hepática *de novo*. Como mecanismo compensatório, a glicose para sintetizar glicogênio no músculo esquelético é redirecionada para triacilglicerol no fígado (94). O desenvolvimento de resistência hepática à insulina, em que a ativação do glicogênio sintase é prejudicada pela insulina, também redireciona a glicose para as vias lipogênicas, exacerbando ainda mais a NAFLD (94, 96).

A autofagia é diminuída na NAFLD, contribuindo para o acúmulo de lipídios hepáticos (97). Os grupos EE, EE/Rapa e END reduziram a maioria das expressões de RNAm (isto é, *Prkaa1*, *Ulk1*, *Mapllc3b*, *Atg5* e *Bnip3*), que estão relacionados a várias etapas da via de autofagia. A diminuição da autofagia no grupo EE pode ser explicada pelos baixos níveis de RNAm de *Prkaa1* e altos níveis de *Mtor*, respectivamente ativador e inibidor autofágico via fosforilação da ULK1 (98). Mesmo suprimindo a via mTORC1 pela rapamicina, com destaque para a diminuição da expressão do RNAm da *Mtor* e p-p70S6K/p70S6K, o grupo EE/Rapa apresentou redução dos genes autofágicos. Os níveis mais elevados de insulina para o grupo EE/Rapa podem ter suprimido a autofagia pela ativação dependente de fosforilação mediada por (PDK1) da proteína quinase B (Akt) (98). Diversas investigações utilizando diferentes condições de saúde demonstraram elevação dos marcadores de autofagia no tecido hepático e

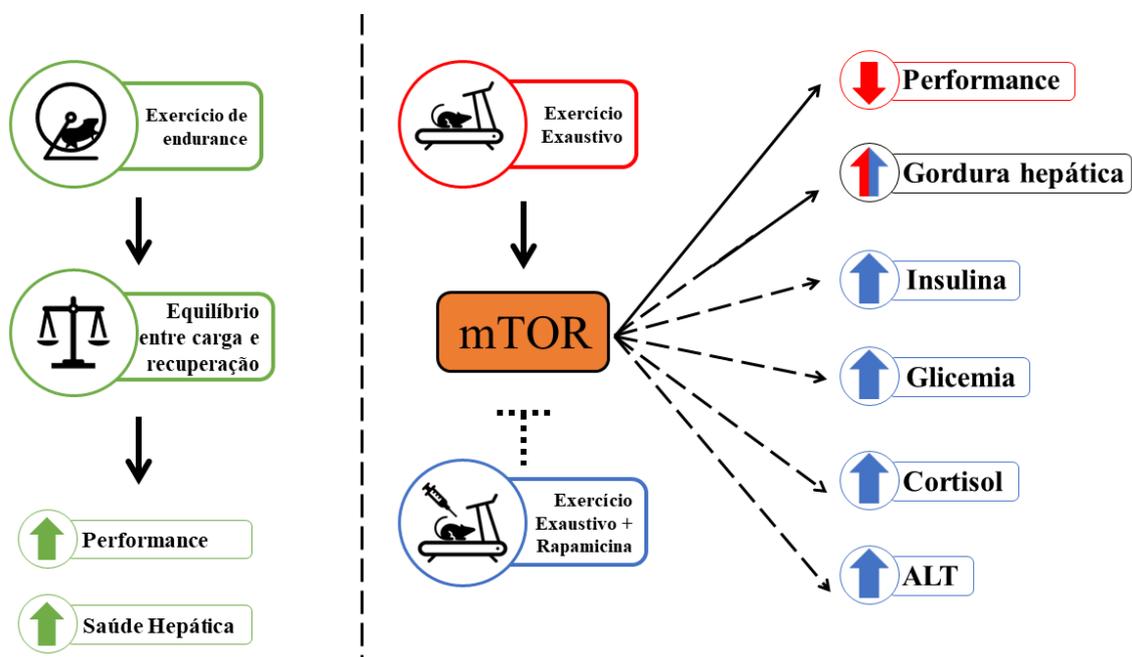
nas células hepáticas após o tratamento com rapamicina (99-103), porém é a primeira vez que a combinação entre excesso de exercício e rapamicina é investigada. da Rocha *et al.* (80) demonstraram a redução de vários genes autofágicos no fígado de camundongos submetidos aos protocolos de endurance ou excessivo. Os autores concluíram que o exercício regular de endurance é um fator epigenético que modifica as expressões gênicas autofágicas no fígado a um novo estado basal (80).

Para analisar o fluxo autofágico, os roedores receberam colchicina, uma droga bloqueadora do autofagossomo que aumenta o conteúdo de Sqstm1/p62 e LC3 II. A ativação autofágica hepática preserva os hepatócitos da morte e lesão celular (104). Os maiores valores de Sqstm1/p62 para os grupos CT e END estão provavelmente associados à saúde do fígado desses animais. Algumas investigações verificaram a indução da autofagia hepática após exercícios de *endurance* (46, 105), mas sem o uso de um bloqueador do autofagossomo, como a colchicina. A imunoproteína de LC3B foi maior para os três grupos exercitados. No entanto, os níveis proteicos de LC3 II no experimento de fluxo autofágico não foram diferentes entre os grupos experimentais. De acordo com o "*Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy*" um problema com a detecção de LC3 por imunohistoquímica é que essa proteína pode ser localizada em estruturas diferentes do autofagossomo em alguns tecidos. Por exemplo, em hepatócitos de roedores, o LC3 endógeno é detectado nos autofagossomos e nas gotículas lipídicas (106), o que poderia justificar os diferentes dados do presente estudo na detecção de LC3 por imunoproteína e *immunoblotting*.

A lipogênese hepática é aumentada em resposta à ativação do fator de transcrição 1 de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c), que parece ser regulado pela insulina a nível transcricional (107). O desenvolvimento de NAFLD aumenta a lipogênese *de novo* (94), visualizada pelos níveis aumentados de RNAm de *Srebfl* e *Fasn* no grupo EE/Rapa. A elevação desses marcadores para o grupo END pode ser resultado do aumento do *turnover* de triacilglicerídeos, possivelmente para atingir o suprimento de energia do exercício e transferir lipídios para outros tecidos como os músculos esqueléticos (51). A p-Foxo1A/Foxo1A foi maior para o grupo EE/Rapa em comparação com o grupo CT. Houde *et al.* (88) verificaram que o tratamento crônico com rapamicina aumentou o conteúdo nuclear de Foxo1. Como resultado dos níveis elevados de insulina, as proteínas Foxo passam por fosforilação e translocação mediada por insulina do núcleo para o citoplasma, gerando a inibição da expressão do gene alvo (108). O grupo EE/Rapa mostrou níveis mais elevados de insulina e, por causa do feedback negativo, níveis mais elevados de proteína de p-Foxo1A/Foxo1A. A p-ULK1/ULK1

foi menor no grupo END, provavelmente devido aos níveis reduzidos de RNAm de *Prkaal*, que é essencial para a fosforilação da ULK1.

Conclui-se, que ambos os grupos submetidos ao excesso de exercício apresentaram acúmulo de gordura hepática, o que parece ser independente da inibição de mTOR, uma vez que o tratamento com rapamicina não evitou essa consequência hepática. Como todos os roedores experimentais exercitados reduziram os marcadores de autofagia, novas investigações são necessárias para desvendar outros mecanismos moleculares capazes de explicar a elevação da gordura no fígado de ratos submetidos ao excesso de exercício. A figura 8 resume os principais achados da presente investigação.



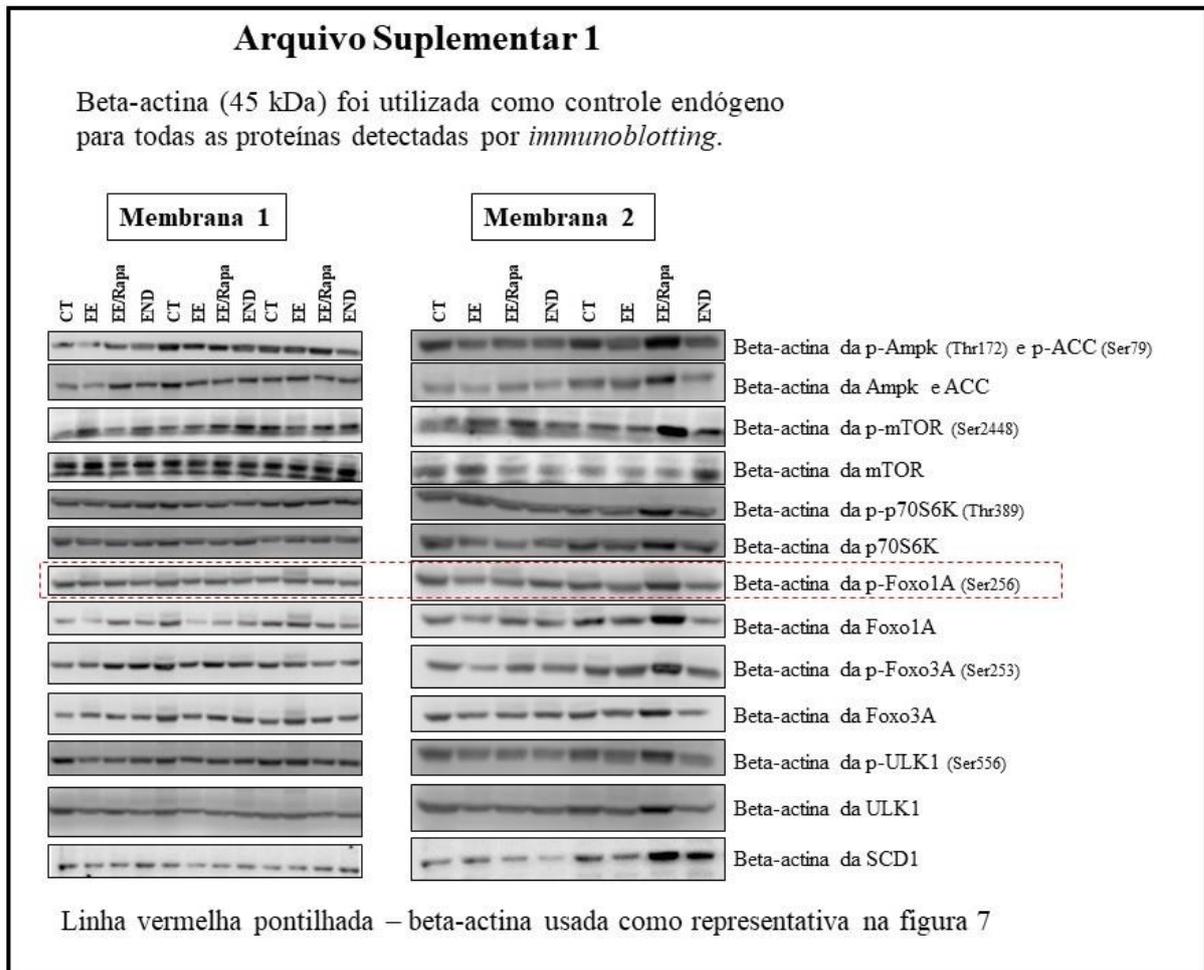
**Figure 8** – Principais achados da presente investigação.

## NOTA

Os presentes resultados foram submetidos como um artigo intitulado “Rapamycin did not prevent the excessive exercise-induced hepatic fat accumulation”

**Rapamycin did not prevent the excessive exercise-induced hepatic fat accumulation**  
 Ana P. Pinto<sup>1</sup>, Alisson L. da Rocha<sup>1</sup>, Giovana R. Teixeira<sup>2,3</sup>, Rafael L. Rovina<sup>4</sup>, Alice S. C. Veras<sup>2</sup>, Fabiani Frantz<sup>2</sup>, José R. Pauli<sup>6</sup>, Leandro P. de Moura<sup>6</sup>, Denny E. Cintra<sup>5</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>6</sup>, Joe Quadrilatero<sup>7</sup>, and Adelino S. R. da Silva<sup>1,4</sup>.  
<sup>1</sup>Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Postgraduate Program in Movement Sciences, São Paulo State University (UNESP), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Department of Physical Education, State University of São Paulo (UNESP), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. <sup>4</sup>School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. <sup>5</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Department of Clinical, Toxicological, and Bromatological Analysis, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. <sup>6</sup>Laboratory of Molecular Biology of Exercise (LaBMEx), School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil. <sup>7</sup>Department of Kinesiology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.  
 \*Corresponding author: Adelino S. R. da Silva. Address: Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, 14040-907, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. E-mail: adelinosanchez@usp.br Phone number: +55-16-33150522. Fax number: +55-16-33150551.

## 6. ARQUIVO SUPLEMENTAR 1



**7. BOLSA ESTÁGIO DE PESQUISA NO EXTERIOR (BEPE)****Novembro 2019 – Novembro 2020****Número Fapesp: 2019/15428-2****Doctorate Student:** Ana Paula Pinto.**Advisor:** Prof. Dr. Adelino Sanchez Ramos da Silva.**Co-Advisor:** Prof. Dr. Joe Quadrilatero.**Institutions:** University of São Paulo (USP) and University of Waterloo.**TITLE:** Role of autophagy in muscle stem cell differentiation

January 16<sup>th</sup>, 2021

Dear Awards Committee:

This letter is to confirm that Ana Pinto worked in my laboratory at the University of Waterloo for a period of 1 year (Nov 2019 to Nov 2020). During this time Ana worked closely with my laboratory on several projects related to skeletal muscle autophagic signaling.

Ana was a regular member of my laboratory and participated in all aspects of our research program. In particular, Ana performed daily laboratory work, communicated with myself and other laboratory members, attended weekly laboratory meetings, put together data, and wrote a paper. Moreover, during this time Ana performed and became proficient in a number of laboratory methods including PCR, Western blotting, flow cytometer, muscle and satellite cell isolation, cell culture methods, fluorescent microscopy, and respirometry. In addition, Ana completed a number of safety and animal training courses while at Waterloo.

While in my laboratory Ana's work focused on 2 major projects. The first, and her primary project was to examine autophagy in skeletal muscle during damage and in response to fasting. This project involved using a skeletal muscle specific transgenic mouse model, cardiotoxin injections to induce damage, and a fasting protocol. For this project Ana isolated muscles and satellite cells, performed various molecular/biochemical assays, and analyzed and synthesized the data. This work was quite successful and makes up the basis of her submitted paper. Overall, the data in this paper is comprehensive and novel, and will be submitted for publication to a peer-reviewed journal in the future.

In addition to the project noted above, Ana was involved in providing PCR support for a project of one of my graduate students. This project involved examining the relationship between NOTCH signaling and autophagy in skeletal muscle. Again, Ana provided a good amount of data to this project, and the data will be included in another peer-reviewed publication once this project is complete.

Overall, not only do I feel Ana had an opportunity to learn new research approaches, techniques, and methodologies, but Ana was an excellent addition to my lab. She not only helped out tremendously during her time in my lab, but was easy to interact with, and provide very good insight into several projects. I feel that Ana's visit to Waterloo was hugely successful, and I would fully endorse her for future awards.

If you have any further questions please do not hesitate to contact me directly.

Sincerely,



Joe Quadriatero, Ph.D.  
Professor  
Department of Kinesiology  
Faculty of Health  
jqadri@uwaterloo.ca

UNIVERSITY OF  
WATERLOO

200 University Avenue West, Waterloo, ON, Canada N2L 3G1  
519-888-4567 | uwaterloo.ca

## 8. TRABALHOS CIENTÍFICOS INTERNACIONAIS

### 8.1. Primeiro autor

- *Manuscrito 1*: “Exhaustive acute exercise-induced ER stress is attenuated in IL-6-knockout mice”. 2019.

<b>Journal of Endocrinology</b>	A P Pinto <i>et al.</i>	Attenuation of ER stress in IL-6-knockout mice	240:2	181-193
---------------------------------	-------------------------	------------------------------------------------	-------	---------

#### RESEARCH

## Exhaustive acute exercise-induced ER stress is attenuated in IL-6-knockout mice

Ana P Pinto<sup>1</sup>, Alisson L da Rocha<sup>1</sup>, Eike B Kohama<sup>1</sup>, Rafael C Gaspar<sup>2</sup>, Fernando M Simabuco<sup>2</sup>, Fabiani G Frantz<sup>3</sup>, Leandro P de Moura<sup>2</sup>, José R Pauli<sup>2</sup>, Dennys E Cintra<sup>2</sup>, Eduardo R Ropelle<sup>2</sup>, Ellen C de Freitas<sup>4</sup> and Adelino S R da Silva<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Biology of Exercise (LaBMEx), School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>Department of Clinical, Toxicological, and Bromatological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Correspondence should be addressed to A S R da Silva: [adelinosanchez@usp.br](mailto:adelinosanchez@usp.br)

#### Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) stress and inflammation relationship occurs at different levels and is essential for the adequate homeostatic function of cellular systems, becoming harmful when chronically engaged. Intense physical exercise enhances serum levels of interleukin 6 (IL-6). In response to a chronic exhaustive physical exercise protocol, our research group verified an increase of the IL-6 concentration and ER stress proteins in extensor digitorum longus (EDL) and soleus. Based on these results, we hypothesized that IL-6-knockout mice would demonstrate a lower modulation in the ER stress proteins compared to the wild-type mice. To clarify the relationship between exercise-induced IL-6 increased and ER stress, we studied the effects of an acute exhaustive physical exercise protocol on the levels of ER stress proteins in the skeletal muscles of IL-6-knockout (KO) mice. The WT group displayed a higher exhaustion time compared to the IL-6 KO group. After 1 h of the acute exercise protocol, the serum levels of IL-6 and IL-10 were enhanced in the WT group. Independent of the experimental group, the CHOP and cleaved caspase 12/total caspase 12 ratio in EDL as well as ATF6 and CHOP in soleus were sensitive to the acute exercise protocol. Compared to the WT group, the oscillation patterns over time of BiP in EDL and soleus as well as of pEiF2- $\alpha$ /eIF2- $\alpha$  ratio in soleus were attenuated for the IL-6 KO group. In conclusion, IL-6 seems to be related with the ER stress homeostasis, once knockout mice presented attenuation of BiP in EDL and soleus as well as of pEiF2- $\alpha$ /EiF2- $\alpha$  ratio in soleus after the acute exhaustive physical exercise protocol.

#### Key Words

- ▶ acute exhaustive exercise
- ▶ ER stress
- ▶ IL-6
- ▶ cellular signaling

*Journal of Endocrinology*  
(2019) 240, 181-193

- **Manuscript 2:** “The Combination of Fasting, Acute Resistance Exercise, and Protein Ingestion Led to Different Responses of Autophagy Markers in Gastrocnemius and Liver Samples”. 2020.



Article

## The Combination of Fasting, Acute Resistance Exercise, and Protein Ingestion Led to Different Responses of Autophagy Markers in Gastrocnemius and Liver Samples

Ana P. Pinto <sup>1</sup> , Tales S. Vieira <sup>2</sup> , Bruno B. Marafon <sup>3</sup>, Gabriela Batitucci <sup>2</sup> ,  
Elisa M. B. Cabrera <sup>4</sup> , Alisson L. da Rocha <sup>1</sup>, Eike B. Kohama <sup>1</sup>, Kellen C. C. Rodrigues <sup>5</sup>,  
Leandro P. de Moura <sup>5</sup> , José R. Pauli <sup>5</sup>, Dennys E. Cintra <sup>5</sup>, Eduardo R. Ropelle <sup>5</sup>,  
Ellen C. de Freitas <sup>2,3</sup> and Adelino S. R. da Silva <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil; anapp\_5@usp.br (A.P.P.); alisson.rocha@usp.br (A.L.d.R.); eike.kohama@usp.br (E.B.K.)

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Nutritional Science, State University of São Paulo Júlio de Mesquita Filho (Araraquara). Araraquara, São Paulo 14800-903, Brazil; talessv@hotmail.com (T.S.V.); gabibatitucci@gmail.com (G.B.); ellenfreitas@usp.br (E.C.d.F.)

<sup>3</sup> School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo 14040-907, Brazil; bruno.marafon@usp.br

<sup>4</sup> Institute of Translational Nutrigenetics and Nutrigenomics, Department of Molecular Biology and Genomics, Health Sciences University Center, University of Guadalajara, Guadalajara 44100, Mexico; eli\_embc@hotmail.com

<sup>5</sup> Laboratory of Molecular Biology of Exercise (LaBMEx), School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo 13484-350, Brazil; kellen.rodrigues.nut@gmail.com (K.C.C.R.); leandropereiram@hotmail.com (L.P.d.M.); rodrigopaulifca@gmail.com (J.R.P.); dcintra@yahoo.com (D.E.C.); eduardoropelle@gmail.com (E.R.R.)

\* Correspondence: adelinosanchez@usp.br; Tel.: +55-16-33150522; Fax: +55-16-33150551

Received: 28 January 2020; Accepted: 26 February 2020; Published: 28 February 2020



**Abstract:** The present study verified the responses of proteins related to the autophagy pathway after 10 h of fast with resistance exercise and protein ingestion in skeletal muscle and liver samples. The rats were distributed into five experimental groups: control (CT; sedentary and without gavage after fast), exercise immediately (EXE-imm; after fast, rats were submitted to the resistance protocol and received water by gavage immediately after exercise), exercise after 1 h (EXE-1h; after fast, rats were submitted to the resistance protocol and received water by gavage 1 h after exercise), exercise and supplementation immediately after exercise (EXE/Suppl-imm; after fast, rats were submitted to the resistance protocol and received a mix of casein: whey protein 1:1 (*w/w*) by gavage immediately after exercise), exercise and supplementation 1 h after exercise (EXE/Suppl-1h; after fast, rats were submitted to the resistance protocol and received a mix of casein: whey protein 1:1 (*w/w*) by gavage 1 h after exercise). In summary, the current findings show that the combination of fasting, acute resistance exercise, and protein blend ingestion (immediately or 1 h after the exercise stimulus) increased the serum levels of leucine, insulin, and glucose, as well as the autophagy protein contents in skeletal muscle, but decreased other proteins related to the autophagic pathway in the liver. These results deserve further mechanistic investigations since athletes are combining fasting with physical exercise to enhance health and performance outcomes.

**Keywords:** resistance exercise; autophagy; leucine; mammalian target of rapamycin (mTOR); liver; muscle

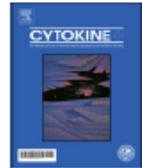
- **Manuscript 3:** “Role of interleukin-6 in inhibiting hepatic autophagy markers in exercised mice”. 2020.

Cytokine 130 (2020) 155085



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cytokine](http://www.elsevier.com/locate/cytokine)

## Role of interleukin-6 in inhibiting hepatic autophagy markers in exercised mice



Ana P. Pinto<sup>a</sup>, Alisson L. da Rocha<sup>a</sup>, Elisa M.B. Cabrera<sup>b</sup>, Bruno B. Marafon<sup>c</sup>, Eike B. Kohama<sup>a</sup>, Rafael L. Rovina<sup>c</sup>, Fernando M. Simabuco<sup>d</sup>, Carlos R. Bueno Junior<sup>c</sup>, Leandro P. de Moura<sup>d</sup>, José R. Pauli<sup>d</sup>, Dennys E. Cintra<sup>d</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>d</sup>, Adelino S.R. da Silva<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Translational Nutrigenetics and Nutrigenomics, Department of Molecular Biology and Genomics, Health Sciences University Center, University of Guadalajara, Guadalajara, Mexico

<sup>c</sup> School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Molecular Biology of Exercise (LaBMEx), School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Apoptosis  
Autophagy  
Endoplasmic reticulum stress  
Inflammation  
Liver

### ABSTRACT

**Background:** Based on the crosstalk of inflammation with apoptosis, autophagy, and endoplasmic reticulum (ER) stress, the main objective of this study was to explore the role of interleukin-6 (IL-6) on genes and proteins related to these phenomena in the livers of mice submitted to acute exhaustive exercise.

**Methods:** Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction and immunoblotting technique were used to evaluate the livers of wild-type (WT) and IL-6 knockout (KO) mice at baseline (BL) and 3 h after the acute exhaustive physical exercise (EE).

**Results:** Compared to the WT at baseline, the IL-6 KO had lower exhaustion velocity, mRNA levels of *Mtor*, *Ulk1*, *Map1lc3b*, and *Mpk14*, and protein contents of ATG5 and p-p70S6K/p70S6K. For the WT group, the EE decreased glycemia, mRNA levels of *Casp3*, *Mtor*, *Ulk1*, *Foxo1a*, *Mpk14*, and *Ppargc1a*, and protein contents of ATG5 and p-p70S6K/p70S6K, but increased mRNA levels of *Sqstm1*. For the IL-6 KO group, the EE decreased glycemia, mRNA levels of *Casp3* and *Foxo1a*, and protein contents of pAkt/Akt and Mature/Pro IL-1 beta, but increased mRNA levels of *Sqstm1*, and protein contents of p-AMPK/AMPK.

**Conclusion:** The inhibition of the hepatic autophagy markers induced by the acute EE was attenuated in IL-6 KO mice, highlighting a new function of this cytokine.

- **Manuscript 4:** “Impact of Different Physical Exercises on the Expression of Autophagy Markers in Mice”. 2021.

Article

## Impact of Different Physical Exercises on the Expression of Autophagy Markers in Mice

Ana P. Pinto <sup>1</sup>, Alisson L. da Rocha <sup>1</sup>, Bruno B. Marafon <sup>2</sup>, Rafael L. Rovina <sup>2</sup>, Vitor R. Muñoz <sup>3</sup>,  
Lilian E. C. M. da Silva <sup>4</sup>, José R. Pauli <sup>3</sup>, Leandro P. de Moura <sup>3</sup>, Dennys E. Cintra <sup>3</sup>, Eduardo R. Ropelle <sup>3</sup>  
and Adelino S. R. da Silva <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto 14040-907, Brazil; anapp\_5@hotmail.com (A.P.P.); alissonldarocha@gmail.com (A.L.d.R.)
- <sup>2</sup> School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto 14040-907, Brazil; bruno.marafon@usp.br (B.B.M.); rafael.rovina@usp.br (R.L.R.)
- <sup>3</sup> Laboratory of Molecular Biology of Exercise (LaBMEx), School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Rua Pedro Zacarias, 1300, Limeira 13484-350, Brazil; vitor.munoz93@gmail.com (V.R.M.); rodrigopaulifca@gmail.com (J.R.P.); leandropereiram@hotmail.com (L.P.d.M.); dcintra@yahoo.com (D.E.C.); eduardoropelle@gmail.com (E.R.R.)
- <sup>4</sup> Department of Ophthalmology, Otorhinolaryngology, and Head and Neck Surgery, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Avenida Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto 14040-907, Brazil; lilianeslaine@fmrp.usp.br
- \* Correspondence: adelinosanchez@hotmail.com; Tel: +55-16-33150522; Fax: +55-16-33150551



Citation: Pinto, A.P.; da Rocha, A.L.; Marafon, B.B.; Rovina, R.L.; Muñoz, V.R.; da Silva, L.E.C.M.; Pauli, J.R.; de Moura, L.P.; Cintra, D.E.; Ropelle, E.R.; et al. Impact of Different Physical Exercises on the Expression of Autophagy Markers in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2635. <https://doi.org/10.3390/ijms22052635>

Received: 2 December 2020

Accepted: 28 December 2020

Published: 5 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Abstract** Although physical exercise-induced autophagy activation has been considered a therapeutic target to enhance tissue health and extend lifespan, the effects of different exercise models on autophagy in specific metabolic tissues are not completely understood. This descriptive investigation compared the acute effects of endurance (END), exhaustive (ET), strength (ST), and concurrent (CC) physical exercise protocols on markers of autophagy, genes, and proteins in the gastrocnemius muscle, heart, and liver of mice. The animals were euthanized immediately (0 h) and six hours (6 h) after the acute exercise for the measurement of glycogen levels, mRNA expression of *Prkaa1*, *Ppargc1a*, *Mtor*, *Ulk1*, *Becn1*, *Atg5*, *Map1lc3b*, *Sqstm1*, and protein levels of Beclin 1 and ATG5. The markers of autophagy were measured by quantifying the protein levels of LC3II and Sqstm1/p62 in response to three consecutive days of intraperitoneal injections of colchicine. In summary, for gastrocnemius muscle samples, the main alterations in mRNA expressions were observed after 6 h and for the ST group, and the markers of autophagy for the CC group were increased (i.e., LC3II and Sqstm1/p62). In the heart, the Beclin 1 and ATG5 levels were downregulated for the ET group. Regarding the markers of autophagy, the Sqstm1/p62 in the heart tissue was upregulated for the END and ST groups, highlighting the beneficial effects of these exercise models. The liver protein levels of ATG5 were downregulated for the ET group. After the colchicine treatment, the liver protein levels of Sqstm1/p62 were decreased for the END and ET groups compared to the CT, ST, and CC groups. These results could be related to diabetes and obesity development or liver dysfunction improvement, demanding further investigations.

**Keywords:** colchicine; autophagic flux; time course; gastrocnemius; heart; liver

## 8.2. Colaborações

- **Manuscrito 1:** “Tlr4 participates in the responses of markers of apoptosis, inflammation, and ER stress to different acute exercise intensities in mice hearts”. 2020.

Life Sciences 240 (2020) 117107



### Tlr4 participates in the responses of markers of apoptosis, inflammation, and ER stress to different acute exercise intensities in mice hearts



Larissa G. de Vicente<sup>a</sup>, Ana P. Pinto<sup>a</sup>, Vitor R. Muñoz<sup>b</sup>, Rafael L. Rovina<sup>c</sup>, Alisson L. da Rocha<sup>a</sup>, Rafael C. Gaspar<sup>b</sup>, Lilian E.C.M. da Silva<sup>d</sup>, Fernando M. Simabuco<sup>b</sup>, Fabiani G. Frantz<sup>e</sup>, José R. Pauli<sup>b</sup>, Leandro P. de Moura<sup>b</sup>, Dennys E. Cintra<sup>b</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>b</sup>, Adelino S.R. da Silva<sup>a,c,\*</sup>

- **Manuscrito 2:** “Hepatic LC3 II/I Ratio Is Not Modulated in Exercised Mice”. 2020.

*Physiol. Res.* 69: 1103-1111, 2020

<https://doi.org/10.33549/physiolres.934441>

### Hepatic LC3 II/I Ratio Is Not Modulated in Exercised Mice

Bruno Brieda MARAFON<sup>1</sup>, Ana Paula PINTO<sup>2</sup>, Alisson Luiz da ROCHA<sup>2</sup>, Rafael Lemes ROVINA<sup>1</sup>, José Rodrigo PAULI<sup>3</sup>, Leandro Pereira DE MOURA<sup>3</sup>, Dennys Esper CINTRA<sup>3</sup>, Eduardo Rochete ROPELLE<sup>3</sup>, Adelino Sanchez Ramos DA SILVA<sup>1,2</sup>

- **Manuscrito 3:** “Role of TLR4 in physical exercise and cardiovascular diseases”. 2020.

Cytokine 136 (2020) 155273



Review article

### Role of TLR4 in physical exercise and cardiovascular diseases



Larissa G. de Vicente<sup>a</sup>, Ana Paula Pinto<sup>a</sup>, Alisson Luiz da Rocha<sup>a</sup>, José R. Pauli<sup>b</sup>, Leandro P. de Moura<sup>b</sup>, Dennys E. Cintra<sup>b</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>b</sup>, Adelino S.R. da Silva<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Molecular Biology of Exercise (LaBMEx), School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

- **Manuscript 4:** “Protein blend and casein supplementations before inactive phase similarly activate mechanistic target of rapamycin signaling in rat skeletal muscle”. 2020.

Original Article

## Protein Blend and Casein Supplementations before Inactive Phase Similarly Activate Mechanistic Target of Rapamycin Signaling in Rat Skeletal Muscle

Tales Sambrano Vieira<sup>1</sup>, Ana P. Pinto<sup>2</sup>, Gabriela Batitucci<sup>1</sup>, Alisson L. da Rocha<sup>2</sup>, Hugo T. Filho<sup>3</sup>, Dawit A. Gonçalves<sup>4,5</sup>, Adelino Sanchez R. da Silva<sup>2,3</sup>, Ellen Cristini de Freitas<sup>1,3\*</sup>

- **Manuscript 5:** “Molecular hydrogen downregulates acute exhaustive exercise-induced skeletal muscle damage”. 2020.

► [Can J Physiol Pharmacol.](#) 2020 Dec 23;1-9. doi: 10.1139/cjpp-2020-0297. Online ahead of print.

## Molecular hydrogen downregulates acute exhaustive exercise-induced skeletal muscle damage

Jonatas E Nogueira<sup>1</sup>, Mateus R Amorim<sup>2</sup>, Ana P Pinto<sup>3</sup>, Alisson L da Rocha<sup>3</sup>, Adelino S R da Silva<sup>1,3</sup>, Luiz G S Branco<sup>2,4</sup>

- **Manuscript 6:** “Moderate, but Not Excessive, Training Attenuates Autophagy Machinery in Metabolic Tissues”. 2020.



International Journal of  
Molecular Sciences



Article

## Moderate, but Not Excessive, Training Attenuates Autophagy Machinery in Metabolic Tissues

Alisson L. da Rocha<sup>1</sup> , Ana P. Pinto<sup>1</sup> , Gustavo P. Morais<sup>1</sup>, Bruno B. Marafon<sup>2</sup>, Rafael L. Rovina<sup>2</sup>, Allice S. C. Veras<sup>3</sup>, Giovana R. Teixeira<sup>3,4</sup> , José R. Pauli<sup>5</sup>, Leandro P. de Moura<sup>5</sup>, Dennys E. Cintra<sup>5</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>5</sup>, Donato A. Rivas<sup>6</sup> and Adelino S. R. da Silva<sup>1,2,\*</sup> 

- **Manuscript 7:** “Interleukin-6 ablation does not alter morphofunctional heart characteristics but modulates physiological and inflammatory markers after strenuous exercise”. 2021.

Cytokine 142 (2021) 155494



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cytokine](http://www.elsevier.com/locate/cytokine)



## Interleukin-6 ablation does not alter morphofunctional heart characteristics but modulates physiological and inflammatory markers after strenuous exercise



Alisson L. da Rocha<sup>a,\*</sup>, Rafael L. Rovina<sup>b</sup>, Ana P. Pinto<sup>a</sup>, Bruno B. Marafon<sup>b</sup>, Lilian E.C. M. da Silva<sup>c</sup>, Fernando M. Simabuco<sup>d</sup>, Fabiani G. Frantz<sup>e</sup>, José R. Pauli<sup>d</sup>, Leandro P. de Moura<sup>d</sup>, Dennys E. Cintra<sup>d</sup>, Eduardo R. Ropelle<sup>d</sup>, Hugo T. Filho<sup>b</sup>, Ellen C. de Freitas<sup>b</sup>, Donato A. Rivas<sup>f</sup>, Adelino S.R. da Silva<sup>a,b</sup>

## REFERÊNCIAS

1. Hall JE. Tratado de Fisiologia Medica. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
2. Adeva-Andany MM, Pérez-Felpete N, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C, Pazos-García C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep.* 2016;36(6).
3. Ueno T, Komatsu M. Autophagy in the liver: functions in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(3):170-84.
4. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2010;90(4):1383-435.
5. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 2014;24(1):9-23.
6. Schneider JL, Cuervo AM. Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology.* 2014;11(3):187-200.
7. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology.* 2010;22(2):124-31.
8. Allaire M, Rautou PE, Codogno P, Lotersztajn S. Autophagy in liver diseases: Time for translation? *J Hepatol.* 2019;70(5):985-98.
9. Kuma A, Mizushima N, editors. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Seminars in cell & developmental biology;* 2010: Elsevier.
10. Komatsu M. Liver autophagy: physiology and pathology. *Journal of biochemistry.* 2012;152(1):5-15.
11. Pauly M, Assense A, Rondon A, Thomas A, Dubouchaud H, Freyssenet D, et al. High intensity aerobic exercise training improves chronic intermittent hypoxia-induced insulin resistance without basal autophagy modulation. *Scientific reports.* 2017;7:43663.
12. Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011;146(5):682-95.
13. Maes H, Rubio N, Garg AD, Agostinis P. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends in molecular medicine.* 2013;19(7):428-46.
14. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science.* 2011;331(6016):456-61.
15. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132-41.
16. Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, et al. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol.* 2010;190(4):511-21.
17. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell.* 2008;30(6):678-88.
18. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell.* 2008;19(5):2092-100.
19. Luo L, Lu AM, Wang Y, Hong A, Chen Y, Hu J, et al. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Experimental gerontology.* 2013;48(4):427-36.
20. Wohlgemuth SE, Seo AY, Marzetti E, Lees HA, Leeuwenburgh C. Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Experimental gerontology.* 2010;45(2):138-48.

21. Cui J, Gong Z, Shen HM. The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1836(1):15-26.
22. Basit F, Cristofanon S, Fulda S. Obatoclox (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death & Differentiation*. 2013;20(9):1161-73.
23. Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci*. 2017;130(7):1209-16.
24. Ke PY. Diverse Functions of Autophagy in Liver Physiology and Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2).
25. Madrigal-Matute J, Cuervo AM. Regulation of Liver Metabolism by Autophagy. *Gastroenterology*. 2016;150(2):328-39.
26. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*. 2011;332(6036):1429-33.
27. Settembre C, De Cegli R, Mansueto G, Saha PK, Vetrini F, Visvikis O, et al. TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat Cell Biol*. 2013;15(6):647-58.
28. Lee JM, Wagner M, Xiao R, Kim KH, Feng D, Lazar MA, et al. Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy. *Nature*. 2014;516(7529):112-5.
29. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013;368(7):651-62.
30. Pfeifer U. Inverted diurnal rhythm of cellular autophagy in liver cells of rats fed a single daily meal. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 1972;10(1):1-3.
31. Kotoulas OB, Kalamidas SA, Kondomerkos DJ. Glycogen autophagy in glucose homeostasis. *Pathol Res Pract*. 2006;202(9):631-8.
32. Jiang S, Heller B, Tagliabracci VS, Zhai L, Irimia JM, DePaoli-Roach AA, et al. Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem*. 2010;285(45):34960-71.
33. Jiang S, Wells CD, Roach PJ. Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(3):420-5.
34. Lapierre LR, Gelino S, Meléndez A, Hansen M. Autophagy and lipid metabolism coordinately modulate life span in germline-less *C. elegans*. *Curr Biol*. 2011;21(18):1507-14.
35. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458(7242):1131-5.
36. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006;40:S17-S29.
37. Kwanten WJ, Martinet W, Michielsen PP, Francque SM. Role of autophagy in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: a controversial issue. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(23):7325-38.
38. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *The FASEB Journal*. 2010;24(8):3052-65.
39. He C, Sumpter R, Levine B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy*. 2012;8(10):1548-51.
40. Musumeci G. Effects of exercise on physical limitations and fatigue in rheumatic diseases. *World J Orthop*. 2015;6(10):762-9.
41. Guo R, Liong EC, So KF, Fung ML, Tipoe GL. Beneficial mechanisms of aerobic exercise on hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2015;14(2):139-44.
42. Trefts E, Williams AS, Wasserman DH. Exercise and the Regulation of Hepatic Metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;135:203-25.

43. Shephard RJ, Johnson N. Effects of physical activity upon the liver. *Eur J Appl Physiol*. 2015;115(1):1-46.
44. Chun SK, Lee S, Yang MJ, Leeuwenburgh C, Kim JS. Exercise-Induced Autophagy in Fatty Liver Disease. *Exerc Sport Sci Rev*. 2017;45(3):181-6.
45. Seldin MM, Lei X, Tan SY, Stanson KP, Wei Z, Wong GW. Skeletal muscle-derived myonectin activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway to suppress autophagy in liver. *J Biol Chem*. 2013;288(50):36073-82.
46. Kwon I, Song W, Jang Y, Choi MD, Vinci DM, Lee Y. Elevation of hepatic autophagy and antioxidative capacity by endurance exercise is associated with suppression of apoptosis in mice. *Ann Hepatol*. 2020;19(1):69-78.
47. Gunadi JW, Tarawan VM, Daniel Ray HR, Wahyudianingsih R, Lucretia T, Tanuwijaya F, et al. Different training intensities induced autophagy and histopathology appearances potentially associated with lipid metabolism in wistar rat liver. *Heliyon*. 2020;6(5):e03874.
48. Santos-Alves E, Marques-Aleixo I, Rizo-Roca D, Torrella JR, Oliveira PJ, Magalhães J, et al. Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling. *Life Sci*. 2015;135:124-30.
49. Bayod S, Del Valle J, Pelegri C, Vilaplana J, Canudas AM, Camins A, et al. Macroautophagic process was differentially modulated by long-term moderate exercise in rat brain and peripheral tissues. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(2):229-39.
50. Rosa-Caldwell ME, Lee DE, Brown JL, Brown LA, Perry RA, Greene ES, et al. Moderate physical activity promotes basal hepatic autophagy in diet-induced obese mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017;42(2):148-56.
51. la Fuente FP, Quezada L, Sepúlveda C, Monsalves-Alvarez M, Rodríguez JM, Sacristán C, et al. Exercise regulates lipid droplet dynamics in normal and fatty liver. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(12):158519.
52. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
53. Alisson L. da Rocha APP, Gustavo P. Morais, Bruno B. Marafon, Rafael L. Rovina, Allice S. C. Veras, Giovana R. Teixeira, José R. Pauli, Leandro P. de Moura, Dennys E. Cintra, Eduardo R. Ropelle, Donato A. Rivas and Adelino S. R. da Silva. Moderate, but Not Excessive, Training Attenuates Autophagy Machinery in Metabolic Tissues *Int J Mol Sci*. 2020;21(8416).
54. Pinto AP dRAL, Marafon B.B, Rovina R.L, Muñoz V.R, da Silva L.E.C.M. , Pauli J.R, de Moura L.P, Cintra D.E, Ropelle E.R, and da Silva A.S.R. Acute impact of different physical exercise models in the autophagy pathway of mice metabolic organs. *Int J Mol Sci*. 2021;21.
55. Marafon BB, Pinto AP, da Rocha AL, Rovina RL, Pauli JR, De Moura LP, et al. Hepatic LC3 II/I ratio is not modulated in exercised mice. *Physiol Res*. 2020.
56. Gonçalves IO, Passos E, Diogo CV, Rocha-Rodrigues S, Santos-Alves E, Oliveira PJ, et al. Exercise mitigates mitochondrial permeability transition pore and quality control mechanisms alterations in nonalcoholic steatohepatitis. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2016;41(3):298-306.
57. Wang B, Zeng J, Gu Q. Exercise restores bioavailability of hydrogen sulfide and promotes autophagy influx in livers of mice fed with high-fat diet. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(6):667-74.
58. Stevanović J, Beleza J, Coxito P, Ascensão A, Magalhães J. Physical exercise and liver "fitness": Role of mitochondrial function and epigenetics-related mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab*. 2020;32:1-14.
59. Meeusen R, Duclos M, Foster C, Fry A, Gleeson M, Nieman D, et al. Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the

- American College of Sports Medicine. *Med Sci Sports Exerc.* 2013;45(1):186-205.
60. da Rocha AL, Pinto AP, Teixeira GR, Pereira BC, Oliveira LC, Silva AC, et al. Exhaustive Training Leads to Hepatic Fat Accumulation. *Journal of cellular physiology.* 2016.
61. da Rocha AL, Pereira BC, Pauli JR, Cintra DE, de Souza CT, Ropelle ER, et al. Downhill Running-Based Overtraining Protocol Improves Hepatic Insulin Signaling Pathway without Concomitant Decrease of Inflammatory Proteins. *PloS one.* 2015;10(10):e0140020.
62. W. Sieghart TF, K. Schmid, D. Cejka, J. Werzowa, F. Wrba, X. Wang, D. Gruber, S. Rasoul-Rockenschaub, M. Peck-Radosavljevic, V. Wacheck. Mammalian target of rapamycin pathway activity in hepatocellular carcinomas of patients undergoing liver transplantation. *Transplantations.* 2007;83:7.
63. Martínez-Cisuelo V, Gómez J, García-Junceda I, Naudí A, Cabré R, Mota-Martorell N, et al. Rapamycin reverses age-related increases in mitochondrial ROS production at complex I, oxidative stress, accumulation of mtDNA fragments inside nuclear DNA, and lipofuscin level, and increases autophagy, in the liver of middle-aged mice. *Exp Gerontol.* 2016;83:130-8.
64. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* 2010;11(6):467-78.
65. Pereira BC, Filho LA, Alves GF, Pauli JR, Ropelle ER, Souza CT, et al. A new overtraining protocol for mice based on downhill running sessions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39(9):793-8.
66. da Rocha AL, Pereira BC, Pauli JR, de Souza CT, Teixeira GR, Lira FS, et al. Downhill Running Excessive Training Inhibits Hypertrophy in Mice Skeletal Muscles with Different Fiber Type Composition. *Journal of cellular physiology.* 2016;231(5):1045-56.
67. Pereira BC, da Rocha AL, Pauli JR, Ropelle ER, de Souza CT, Cintra DE, et al. Excessive eccentric exercise leads to transitory hypothalamic inflammation, which may contribute to the low body weight gain and food intake in overtrained mice. *Neuroscience.* 2015;311:231-42.
68. Pereira BC, Lucas G, da Rocha AL, Pauli JR, Ropelle ER, Cintra D, et al. Eccentric Exercise Leads to Glial Activation but not Apoptosis in Mice Spinal Cords. *International journal of sports medicine.* 2015;36(5):378-85.
69. Kuipers H, Verstappen FTJ, Keizer HA, Geurten P, Vankranenburg G. VARIABILITY OF AEROBIC PERFORMANCE IN THE LABORATORY AND ITS PHYSIOLOGIC CORRELATES. *International Journal of Sports Medicine.* 1985;6(4):197-201.
70. Pinto AP, da Rocha AL, Oliveira LDC, Morais GP, de Vicente LG, Cintra DE, et al. Levels of Hepatic Activating Transcription Factor 6 and Caspase-3 Are Downregulated in Mice after Excessive Training. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:247.
71. Gurley JM, Griesel BA, Olson AL. Increased Skeletal Muscle GLUT4 Expression in Obese Mice After Voluntary Wheel Running Exercise Is Posttranscriptional. *Diabetes.* 2016;65(10):2911-9.
72. Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch.* 2011;459(5):477-85.
73. Hewitt SM, Baskin DG, Frevort CW, Stahl WL, Rosa-Molinar E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *J Histochem Cytochem.* 2014;62(10):693-7.
74. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2016;12(1):1-222.

75. Ju JS, Varadhachary AS, Miller SE, Wehl CC. Quantitation of "autophagic flux" in mature skeletal muscle. *Autophagy*. 2010;6(7):929-35.
76. Carter HN, Kim Y, Erlich AT, Zarrin-Khat D, Hood DA. Autophagy and mitophagy flux in young and aged skeletal muscle following chronic contractile activity. *The Journal of physiology*. 2018;596(16):3567-84.
77. Kim Y, Triolo M, Erlich AT, Hood DA. Regulation of autophagic and mitophagic flux during chronic contractile activity-induced muscle adaptations. *Pflug Arch Eur J Phy*. 2019;471(3):431-40.
78. Pinto AP, da Rocha AL, Kohama EB, Gaspar RC, Simabuco FM, Frantz FG, et al. Exhaustive acute exercise-induced ER stress is attenuated in IL-6-knockout mice. *J Endocrinol*. 2019;240(2):181-93.
79. da Rocha AL, Teixeira GR, Pinto AP, de Morais GP, Oliveira LDC, de Vicente LG, et al. Excessive training induces molecular signs of pathologic cardiac hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2018;233(11):8850-61.
80. da Rocha AL, Pinto AP, Morais GP, Marafon BB, Rovina RL, Veras ASC, et al. Moderate, but Not Excessive, Training Attenuates Autophagy Machinery in Metabolic Tissues. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22).
81. Bonawitz ND, Chatenay-Lapointe M, Pan Y, Shadel GS. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab*. 2007;5(4):265-77.
82. Bitto A, Ito TK, Pineda VV, LeTexier NJ, Huang HZ, Sutlief E, et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *Elife*. 2016;5.
83. Bai X, Wey MC, Fernandez E, Hart MJ, Gelfond J, Bokov AF, et al. Rapamycin improves motor function, reduces 4-hydroxynonenal adducted protein in brain, and attenuates synaptic injury in a mouse model of synucleinopathy. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*. 2015;5:28743.
84. Tain LS, Mortiboys H, Tao RN, Ziviani E, Bandmann O, Whitworth AJ. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci*. 2009;12(9):1129-35.
85. Liu Y, Diaz V, Fernandez E, Strong R, Ye L, Baur JA, et al. Rapamycin-induced metabolic defects are reversible in both lean and obese mice. *Aging (Albany NY)*. 2014;6(9):742-54.
86. Arriola Apelo SI, Neuman JC, Baar EL, Syed FA, Cummings NE, Brar HK, et al. Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system. *Aging Cell*. 2016;15(1):28-38.
87. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*. 2012;335(6076):1638-43.
88. Houde VP, Brûlé S, Festuccia WT, Blanchard PG, Bellmann K, Deshaies Y, et al. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes*. 2010;59(6):1338-48.
89. Matsumoto M, Han S, Kitamura T, Accili D. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2464-72.
90. Fang Y, Westbrook R, Hill C, Boparai RK, Arum O, Spong A, et al. Duration of rapamycin treatment has differential effects on metabolism in mice. *Cell Metab*. 2013;17(3):456-62.
91. Liao Y, Su R, Zhang P, Yuan B, Li L. Cortisol inhibits mTOR signaling in avascular necrosis of the femoral head. *J Orthop Surg Res*. 2017;12(1):154.
92. Kuzman JA, O'Connell TD, Gerdes AM. Rapamycin prevents thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. *Endocrinology*. 2007;148(7):3477-84.
93. Urhausen A, Gabriel H, Kindermann W. Blood hormones as

- markers of training stress and overtraining. *Sports Med.* 1995;20(4):251-76.
94. Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell.* 2021;184(10):2537-64.
95. Pereira BC, da Rocha AL, Pinto AP, Pauli JR, Moura LP, Mekary R, et al. Excessive training impairs the insulin signal transduction in mice skeletal muscles. *J Endocrinol.* 2016.
96. Flannery C, Dufour S, Rabøl R, Shulman GI, Petersen KF. Skeletal muscle insulin resistance promotes increased hepatic de novo lipogenesis, hyperlipidemia, and hepatic steatosis in the elderly. *Diabetes.* 2012;61(11):2711-7.
97. Fukuo Y, Yamashina S, Sonoue H, Arakawa A, Nakadera E, Aoyama T, et al. Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepato Res.* 2014;44(9):1026-36.
98. Al-Bari MAA, Xu P. Molecular regulation of autophagy machinery by mTOR-dependent and -independent pathways. *Ann N Y Acad Sci.* 2020;1467(1):3-20.
99. Zhang T, Yan J, Wang N, Dai L, Wang Y, Cai W. Autophagy May Protect Against Parenteral Nutrition-Associated Liver Disease by Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2019;43(1):96-106.
100. Lu Y, Cederbaum AI. Autophagy Protects against CYP2E1/Chronic Ethanol-Induced Hepatotoxicity. *Biomolecules.* 2015;5(4):2659-74.
101. Farah BL, Landau DJ, Sinha RA, Brooks ED, Wu Y, Fung SYS, et al. Induction of autophagy improves hepatic lipid metabolism in glucose-6-phosphatase deficiency. *J Hepatol.* 2016;64(2):370-9.
102. Sun Y, Zou H, Yang L, Zhou M, Shi X, Yang Y, et al. Effect on the liver cancer cell invasion ability by studying the associations between autophagy and TRAP1 expression. *Oncol Lett.* 2018;16(1):991-7.
103. Park HS, Song JW, Park JH, Lim BK, Moon OS, Son HY, et al. TXNIP/VDUP1 attenuates steatohepatitis via autophagy and fatty acid oxidation. *Autophagy.* 2020:1-16.
104. Wu WKK, Zhang L, Chan MTV. Autophagy, NAFLD and NAFLD-Related HCC. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1061:127-38.
105. Kristensen CM, Olsen MA, Jessen H, Brandt N, Meldgaard JN, Pilegaard H. PGC-1 $\alpha$  in exercise and fasting-induced regulation of hepatic UPR in mice. *Pflugers Arch.* 2018;470(10):1431-47.
106. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy.* 2021;17(1):1-382.
107. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Fofelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 2004;86(11):839-48.
108. Lee S, Dong HH. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *J Endocrinol.* 2017;233(2):R67-R79.