

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

TIEGO APARECIDO DINIZ

Avaliação dos efeitos agudos e crônicos do exercício físico no músculo esquelético e fígado em camundongos submetidos à dieta padrão e hiperlipídica: participação da AMPK

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2021

TIEGO APARECIDO DINIZ

Avaliação dos efeitos agudos e crônicos do exercício físico no músculo esquelético e fígado em camundongos submetidos à dieta padrão e hiperlipídica: participação da AMPK

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia celular, tecidual e do desenvolvimento

Orientador: Prof^o Dr. José Cesar Rosa Neto

Versão original

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Aparecido Diniz, Tiego

Avaliação dos efeitos agudos e crônicos do exercício físico no músculo esquelético e fígado em camundongos submetidos à dieta padrão e hiperlipídica: participação da AMPK / Tiego Aparecido Diniz; orientador José Cesar Rosa Neto. -- São Paulo, 2021.

108 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Exercício físico. 2. Fígado gorduroso. 3. Adiponectina. 4. Obesidade. I. Rosa Neto, José Cesar, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO TREINAMENTO AERÓBIO NO TECIDO ADIPOSITO: O PAPEL MEDIADOR DA ADIPONECTINA**", registrado sob o protocolo nº **46/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **12/08/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) José Cesar Rosa Neto**
- Departamento: *Biologia Celular e do Desenvolvimento*
- Membros da Equipe: *Tiago Aparecido Diniz (Pós-graduando), Adriane Pereira Fernandes Araujo (Auxiliar de Laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**ASSESSMENT OF THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF ENDURANCE TRAINING IN ADIPOSE TISSUE: THE POSSIBLE MEDIATING ROLE OF ADIPONECTIN**", protocol nº **46/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/12/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) José Cesar Rosa Neto**
- Team members: *Tiago Aparecido Diniz (Graduate Student), Adriane Pereira Fernandes Araujo (Auxiliar de Laboratório/Laboratory Technician)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>AdiponectinaKO</i> <i>C57BL/6</i>	<i>Macho/male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	52
		<i>Macho/male</i>	<i>8 semanas/weeks</i>	38

São Paulo, 19 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP



**Dedico esse trabalho à minha esposa, meus pais, meu irmão e meus sogros
que foram a base para que esse objetivo fosse alcançado**

AGRADECIMENTOS

Chegamos ao fim dessa longa caminhada. Lá se foram cinco anos desde que me ingressei no Laboratório de Imunometabolismo. Ainda me lembro da ansiedade em falar pela primeira vez com o Prof^o Zeca em um simples e-mail no qual mostrava meu interesse pela vaga de doutorado. Lembro também como se fosse hoje de há 6 anos fazer um estágio de um mês no laboratório para “aprender as técnicas”, no qual depois percebi que era mais para ver meu real interesse na vaga e meu caráter que qualquer experimento. É por isso que aqui meu primeiro agradecimento vai ao Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto por ter me acolhido no laboratório mesmo eu sendo um completo desconhecido. Após muitos cafezinhos e conversas filosóficas, o considero um grande amigo. Sem muito “puxa-saquismo”, te considero um exemplo de orientador, pessoa e pai. Queria muito agradecer a sua paciência e compreensão durante todo o processo, especialmente, esse último ano e também por todo ensinamento nesses últimos anos, que vão além do que essa tese apresenta.

Gostaria também de agradecer aos colegas de laboratório de Imunometabolismo, o Edinho, Xandy, Camila, Luana, Loreana, Helena, Jeff e Carol por toda ajuda e companheirismo nesse período. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço também à nossa técnica de laboratório Adriane Pereira pelo suporte e ensinamentos durante meu período no laboratório.

À minha companheira, amiga e esposa Isabela, que me apoiou durante todo o processo, não medindo esforços para que fossemos felizes. Foram muitos restaurantes, trilhas, ciclismo, parques e momento inesquecíveis que vou guardar para vida toda.

Aos meus pais, Joberto e Roseli, que mesmo sem as condições ideais se sacrificaram para que eu pudesse ter um futuro melhor do que a realidade permitia. Espero um dia ser digno de todo esse esforço.

Aos meus amigos dos Altos do Butantã, Gláucio, Daniel Banana, Vitor, Paulin, Gustavo Bahiano, e o agregado Iuri, que tornaram a caminhada mais leve e prazerosa. Vou guardar na memória todas as boas recordações dos almoços e jantas no RU, do futebol na TV toda quarta e o fut quinta com BigX Jaguaré.

À todos os professores que contribuíram para minha formação e de alguma forma para a conclusão dessa tese, em especial aos professores Dr. Fábio Santos de Lira, Dr. William Tadeu Lara Festuccia e Marília Seelaender e suas respectivas equipes pela colaboração durante todo o projeto.

Aos funcionários do ICB pelo apoio.

AGRADECIMENTO À AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunometabolismo do Instituto de Ciências Biomédicas (São Paulo, Brasil) com o auxílio financeiro da FAPESP, processo nº 2016/02696-0.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas e apoio financeiro essenciais para a elaboração deste trabalho. Agradecemos também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

RESUMO

DINIZ, T. A. **Avaliação dos efeitos agudos e crônicos do exercício físico no músculo esquelético e fígado em camundongos submetidos à dieta padrão e hiperlipídica: participação da AMPK.** 2021. 109 f. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) tem sido apontada como um dos principais elos entre o exercício físico e a saúde metabólica, entretanto, seu papel durante o exercício físico agudo e crônico ainda não está totalmente elucidado. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram: i) avaliar a participação da AMPK na ausência e presença de adiponectina após uma sessão de exercício agudo e; ii) avaliar o papel da AMPK na melhora de parâmetros do fígado gorduroso após 8 semanas de treinamento aeróbio. Para isso, foram utilizados camundongos C57BL/6 (WT) e adiponectina *knockout* (AdKO) em dois desenhos experimentais distintos. No primeiro, animais WT e AdKO foram divididos em grupo exercício e sedentário. Posteriormente, os grupos foram subdivididos em 2 e 24 horas após o exercício físico, juntamente com seu controle sedentário. Para o segundo desenho experimental, animais WT foram divididos em três grupos, dieta padrão (SD), dieta hiperlipídica (HFD) e dieta hiperlipídica associada à 8 semanas de treinamento de aeróbio (HFD+T). Para o primeiro desenho experimental, o conteúdo de glicogênio estava aumentado em animais AdKO (valor $p = 0,005$). No grupo WT, foi encontrado um aumento na fosforilação de AMPK 2 horas após o exercício, retornando ao nível basal 24 horas após. Confirmando a ativação de AMPK, a fosforilação de acetil-CoA carboxilase (Ser79) estava aumentada 2 horas após o exercício e voltou ao basal 24 horas após, desfechos que não foram observados em camundongos AdKO. No grupo WT, as concentrações de IL-10 e IL-6 estavam aumentadas 2 horas (p -valor $<0,01$) e 24 horas (p -valor $<0,001$) após o exercício quando comparadas com ao grupo AdKO. Para o segundo desenho experimental, o grupo HFD+T apresentou melhora nos níveis plasmáticos de lipídios e na resistência à insulina. Em relação aos marcadores da doença hepática gordurosa não-alcóolica, foi encontrado que a progressão da esteatose macrovesicular e inflamação estava diminuída no grupo HFD+T, concomitantemente ao aumento da fosforilação de AMPK (Thr172) e expressão proteica de PPAR- α , assim como seus genes alvo *Acox* e *Cpt1a*. Além disso, foi encontrado um aumento da expressão gênica de genes alvo do PPAR- γ , como o *Cd36* e *Scd1*. No grupo HFD+T foi encontrada reduzida a concentração de citocinas hepáticas, como TNF- α , IL-10, MCP-1 e IL-6, independentemente do aumento da fosforilação de NF- κ B (Ser536). De fato, nenhuma das intervenções regulou os genes alvo de NF- κ B Il1b e *Ccl2*, demonstrando baixa atividade transcricional. Tomados em conjunto, pode-se concluir que: i) a adiponectina influencia o metabolismo muscular, principalmente pela diminuição da fosforilação da AMPK induzida pelo exercício, do perfil inflamatório e da IL-6 no músculo e, ii) o treinamento aeróbio atenua a progressão da esteatose macrovesicular e inflamação hepática por meio da sinalização AMPK-PPAR- α e ativação do PPAR- γ , respectivamente, melhorando a resistência à insulina em camundongos obesos.

Palavras-chave: Exercício físico. Fígado gorduroso. Adiponectina. Obesidade.

ABSTRACT

DINIZ, T. A. **Evaluation of acute and chronic effects of physical exercise on skeletal muscle and liver in mice submitted to standard and high-fat diet: the role of AMPK.** 2021. 109 f. Ph.D Thesis (Life System Biology) – Institute of Biomedical Sciences - University of São Paulo, São Paulo, 2021.

The AMP-activated protein kinase (AMPK) has been identified as one of the main links between physical exercise and metabolic health, however, its role during acute and chronic physical exercise still not fully elucidated. Thus, the objectives of the present study were: i) to evaluate the participation of AMPK in the absence and presence of adiponectin after an acute exercise session and; ii) to evaluate the role of AMPK in improving fatty liver parameters after 8 weeks of aerobic training. For this, C57BL/6 mice (WT) and adiponectin knockout (AdKO) were used in two different experimental designs. In the first, WT and AdKO animals were divided into exercise and sedentary groups. Subsequently, the groups were subdivided into 2 and 24 hours after acute physical exercise, along with their sedentary peers. For the second experimental design, WT animals were divided into three groups, standard diet (SD), high-fat diet (HFD) and high-fat diet associated with 8 weeks of aerobic training (HFD+T). For the first experimental design, the glycogen content was increased in AdKO animals (p value = 0.005). In the WT group, an increase in AMPK phosphorylation was found 2 hours after exercise, returning to the basal level 24 hours later. Confirming AMPK activation, acetyl-CoA carboxylase (Ser79) phosphorylation was increased 2 hours after exercise and returned to baseline 24 hours later, outcomes that were not observed in AdKO mice. In the WT group, IL-10 and IL-6 concentrations were increased 2 hours (p-value <0.01) and 24 hours (p-value <0.001) after exercise when compared to the AdKO group. For the second experimental design, the HFD+T group showed improvement in plasma lipid levels and insulin resistance. Regarding non-alcoholic fatty liver disease markers, it was found that the progression of macrovesicular steatosis and inflammation was decreased in the HFD+T group, concomitantly with the increase in AMPK phosphorylation (Thr172) and PPAR- α protein expression, as well as its target genes *Acox* and *Cpt1a*. Furthermore, an increase in the gene expression of PPAR- γ target genes was found, such as *Cd36* and *Scd1*. In the HFD+T group, the concentration of hepatic cytokines such as TNF- α , IL-10, MCP-1 and IL-6 was reduced, regardless the increase in NF- κ B phosphorylation (Ser536). In fact, none of the interventions regulated NF- κ B target genes (*Il1b* and *Ccl2*), demonstrating low transcriptional activity. Taken together, it can be concluded that: i) adiponectin influences muscle metabolism, mainly by decreasing exercise-induced AMPK phosphorylation, inflammatory profile and IL-6 release in skeletal muscle, and ii) aerobic training attenuates progression of macrovesicular steatosis and liver inflammation through AMPK-PPAR- α signaling and PPAR- γ activation, respectively, improving insulin resistance in obese mice.

Keywords: Physical exercise. Fatty liver. Adiponectin. Obesity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação da AMPK pelo exercício físico.	81
Figura 2. Subunidades, isoformas e principais domínios da AMPK.	82
Figura 3. Regulação da oxidação de lipídios pela AMPK.....	83
Figura 4. Comunicação músculo-órgãos.	84
Figura 5. Desenho experimental.....	85
Figura 6. Efeito do exercício aeróbio agudo na conteúdo proteico e expressão gênica de adiponectina no soro e gastrocnêmio de animais WT e AdKO.....	86
Figura 7. Diferenças entre genótipos no perfil metabólico.	87
Figura 8. Diferenças entre genótipos no acúmulo muscular de lipídeos.	88
Figura 9. Camundongos AdKO apresentaram ativação de AMPK muscular alterada após exercício aeróbio agudo.	89
Figura 10. A expressão de proteica de IL-6 no músculo gastrocnêmio foi suprimida após o exercício físico agudo na ausência de adiponectina.	90
Figura 11. O exercício agudo promove um fenótipo inflamatório diferente entre os genótipos.	91
Figura 12. Animais AdKO apresentam diferente expressão proteica de NF-κB após o exercício agudo no músculo gastrocnêmio	92
Figura 13. Diagrama esquemático dos efeitos do exercício físico na musculatura esquelética na presença ou ausência de adiponectina.	93
Figura 14. A dieta hiperlipídica não aumentou a produção de citocinas nos tecidos adiposos.	94
Figura 15. A dieta hiperlipídica não modulou a ativação de NF-κB no tecido adiposo subcutâneo, mas regulou positivamente a expressão proteica de PPAR-γ.	95
Figura 16. Desenho experimental e efeitos do treinamento aeróbio em parâmetros fisiológicos.	96
Figura 17. Treinamento aeróbio atenua o ganho de peso corporal.	97
Figura 18. Diferenças entre a massa magra e gorda entre os grupos experimentais..	98
Figura 19. Treinamento aeróbio atenua a hipertrofia do adipócito, mas não o índice de adiposidade.....	99
Figura 20. Treinamento aeróbio melhora o perfil lipídico.	100
Figura 21. Treinamento aeróbio atenua a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica.	101
Figura 22. A dieta hiperlipídica aumenta o peso do fígado.	102
Figura 23. Treinamento aeróbio atenua a progressão da esteatose macrovesicular e inflamação hepática.....	103
Figura 24. A dieta hiperlipídica não aumentou a quantidade de colágeno no fígado.	104

Figura 25. O treinamento aeróbico ativa a sinalização AMPK-PPAR-α e PPAR-γ hepática.....	105
Figura 26. Efeito da dieta hiperlipídica e treinamento aeróbico na expressão proteica dos complexos mitocondriais.	106
Figura 27. O treinamento aeróbico alivia a inflamação do fígado, independentemente da expressão de NF-κB.	107
Figura 28. O treinamento aeróbico atenua os marcadores da NAFLD por meio da sinalização AMPK-PPAR-α e da ativação do PPAR-γ.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de NAFLD.	40
Tabela 2. Sequências dos primers do RT-PCR.....	41
Tabela 3. Índice de adiposidade e muscular e desempenho no teste de velocidade máxima entre os genótipos.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACC - Acetil-CoA carboxilase
- AdipoR1 - Receptor de adiponectina do tipo 1
- AdKO - Adiponectina knockout
- ADP - Adenosina difosfato
- AICAR - 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribofuranoside
- AID - Domínio auto-inibitório
- AMP - Adenosina monofosfato
- AMPK - Proteína quinase ativada por AMP
- ATP - Adenosina trifosfato
- BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- C2C12 - Linhagem celular de mioblasto de camundongo imortalizado
- Ca²⁺ - Cálcio
- CaMKK - Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina
- CBM - Domínio de interação com carboidratos
- CBS - Cystathionine β -synthase
- cDNA - DNA complementar
- ChREBP-1 - Proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos
- CPT-1 - Carnitina palmitoil transferase I
- ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
- FAS - Ácido graxo sintase
- G6Pase - Glicose-6-fosfatase
- GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GLUT4 - Transportador de glicose do tipo 4
- GTT - Teste de tolerância à glicose
- HE - Hematoxilina e eosina
- HFD - Dieta hiperlipídica
- HMGCS - Hidroximetilglutaril-CoA sintase
- HSC - Células estreladas hepáticas
- IL - Interleucina
- IR - Receptor de insulina
- IRS-1 - Substrato do receptor de insulina-1

KO - Knockout

LKB1 - Liver kinase B1

M1 - Macrófagos do tipo 1

MAS - Teste incremental de desempenho máximo

MCP-1 - Proteína quimioatraente de monócito-1

mdKO - Deleção músculo-específica

MEF-2 - Fator de aumento de miócitos-2

MO25 - Mouse protein 25

mTOR1 - Alvo mecanístico do complexo 2 da rapamicina

mTORC2 - Alvo mecanístico do complexo 1 da rapamicina

NAFLD - Doença hepática gordurosa não-alcoólica

NASH - Esteato-hepatite não alcoólica

NEFA - Ácido graxo livre não-esterificado

NFAT - Fator nuclear das células T ativadas

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

OXPHOS - Oxidação fosforilativa

PAS - Ácido periódico

PBS - Tampão Salino-Fosfato

PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PGC-1 α - Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PP - Proteína fosfatase

PPAR - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

RNA - Ácido ribonucleico

RT-PCR - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SD - Dieta padrão

SIRT-1 - Sirtuina 1

SREBP - Proteína de Ligação a Elemento Regulador de Esterol

STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição

STRAD - Ste20-related adaptor

SB - Sudan Black

T2D - Diabetes mellitus tipo 2

TFAM - Fator de transcrição mitocondrial A

TGF- β - Fator de Crescimento Transformador- β

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

UCP - Proteína desacopladora

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

VO₂máx - Consumo máximo de oxigênio

WT - Tipo selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Obesidade</i>	19
1.2 <i>Doença hepática gordurosa não-alcoólica (NAFLD)</i>	20
1.3 <i>AMPK como guardião do metabolismo energético</i>	21
1.4 <i>Efeito do exercício físico</i>	25
1.4.1 <i>Musculatura esquelética</i>	25
1.4.1.1 <i>Ativação dos complexos da AMPK é dependente da intensidade e volume do exercício físico</i>	25
1.4.1.2 <i>Efeitos da ativação da AMPK no músculo esquelético</i>	27
1.4.1.3 <i>Regulação das miocinas pela AMPK</i>	29
1.4.2 <i>Fígado</i>	31
2. OBJETIVO	34
2.1 <i>Objetivos específicos</i>	35
2.1.1 <i>Analisar a participação da adiponectina na ativação e expressão de AMPK e IL-6 no músculo esquelético após sessão aguda de exercício físico em esteira rolante.</i>	35
2.1.2 <i>Analisar a participação da adiponectina na inflamação muscular 2 e 24 horas após uma sessão aguda de exercício físico em esteira rolante.</i>	35
2.1.3 <i>Analisar o efeito de 12 semanas de treinamento aeróbio à 60% da velocidade máxima na composição corporal, controle glicêmico, marcadores de esteatose hepática e inflamação de animais C57BL/6 obesos.</i>	35
2.1.4 <i>Investigar os possíveis mediadores das alterações hepáticas na inflamação e esteatose mediada por dieta rica em lipídios.</i>	35
3. MÉTODOS	35
3.1 <i>Protocolos experimentais</i>	35
3.1.1 <i>Protocolo experimental 1 – O papel da adiponectina como miocina na resposta metabólica e inflamatória do exercício agudo de moderada intensidade na musculatura esquelética</i>	35
3.1.1.1 <i>Protocolo de teste máximo</i>	35
3.1.1.2 <i>Protocolo de exercício agudo</i>	36
3.1.1.3 <i>Eutanásia</i>	36
3.1.2 <i>Protocolo experimental 2 - O papel do treinamento aeróbio na regulação do metabolismo e inflamação hepática em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios.</i>	36
3.1.2.1 <i>Protocolo de teste máximo e de treinamento aeróbio</i>	37
3.1.2.2 <i>Eutanásia</i>	37
3.2 <i>Avaliação de parâmetros plasmáticos</i>	37
3.3 <i>Teste de tolerância à glicose (GTT)</i>	38
3.4 <i>Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)</i>	38

3.5	<i>Determinação da expressão proteica</i>	38
3.6	<i>Histologia</i>	39
3.7	<i>NAFLD e esteato-hepatite não alcoólica (NASH) escore</i>	40
3.8	<i>Folch</i>	40
3.9	<i>Isolamento de RNA, transcrição reversa e qRT-PCR</i>	41
3.10	<i>Atividade da citrato sintase</i>	42
3.11	<i>Análise Estatística</i>	42
4.	RESULTADOS	42
4.1	<i>Protocolo experimental 1 – O papel da adiponectina como miocina na resposta metabólica e inflamatória do exercício agudo de moderada intensidade na musculatura esquelética</i>	42
4.1.1	<i>Exercício aeróbio agudo aumenta a concentração sérica e muscular de adiponectina</i>	42
4.1.2	<i>Animais AdKO apresentam um perfil metabólico alterado após o exercício aeróbio agudo</i>	43
4.1.3	<i>A expressão proteica de interleucina-6 é suprimida após exercício aeróbio na ausência de adiponectina</i>	44
4.1.4	<i>O perfil inflamatório após exercício agudo é perturbado na ausência de adiponectina</i>	44
4.2	<i>Protocolo experimental 2 - O papel do treinamento aeróbio na regulação do metabolismo e inflamação hepática em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios.</i>	46
4.2.1	<i>A dieta hiperlipídica não aumentou a inflamação nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal</i>	46
4.2.2	<i>O treinamento aeróbio melhora a atividade da citrato sintase</i>	46
4.2.3	<i>O treinamento aeróbio atenua o aumento de peso corporal, reduz a ingestão calórica e melhora a sensibilidade à insulina</i>	47
4.2.4	<i>O treinamento aeróbio atenua a progressão da esteatose macrovesicular e inflamação através da via AMPK-PPAR-α e ativação de PPAR-γ</i>	48
5.	Discussão	50
5.1	<i>Protocolo experimental 1 – O papel da adiponectina como miocina na resposta metabólica e inflamatória do exercício agudo de moderada intensidade na musculatura esquelética</i>	50
5.2	<i>Protocolo experimental 2 – O papel do treinamento aeróbio na regulação do metabolismo e inflamação hepática em camundongos alimentados com dieta rica em lipídeos.</i>	56
6.	CONCLUSÃO	61
7.	REFERÊNCIAS	62
8.	FIGURAS E LEGENDAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A prevalência da obesidade tem crescido no mundo todo nas últimas décadas. Dados da Organização mundial da saúde mostram que a prevalência global aumentou em pelo menos duas vezes, desde 1980 (BASTIEN et al., 2014). No Brasil, os índices da obesidade triplicaram entre os homens e quase que dobraram entre as mulheres no período de 1975 e 2003. A prevalência atual brasileira de sobrepeso e obesidade são 50,8% e 17,5%, respectivamente (VIGITEL, 2013).

O aumento da prevalência da obesidade é seguido pelo desenvolvimento da síndrome metabólica. De fato, uma quantidade aumentada de gordura corporal, especialmente nos depósitos viscerais, está relacionada com diversas doenças crônicas não-transmissíveis, como a hipertensão, aterosclerose, resistência à insulina e doenças cardiovasculares, as quais foram contemporaneamente identificadas como doenças relacionadas com a inflamação crônica de baixo grau (VAN GAAL et al., 2006; PEDERSEN, 2009).

Adicionalmente as funções clássicas do tecido adiposo, como termoregulação, armazenamento de energia e proteção contra choques mecânicos (TRAYHURN & BEATTIE, 2001), na década de 90 este tecido foi reconhecido como um órgão endócrino, baseado na sua habilidade de secretar adipocinas, hormônios e proteínas (ZHANG et al., 1994).

Diversos estudos têm mostrado que o tecido adiposo, especialmente o visceral, torna-se hipertrofiado devido à alta ingestão de gorduras e a falta de exercícios físicos (SALANS et al., 1971; HOSOOKA et al., 2008; PEDERSEN, 2009; BASTIEN et al., 2014). Esse processo leva a um suprimento inadequado de oxigênio, levando a uma diminuição na pressão de oxigênio local (TRAYHURN, 2013). Acredita-se que esse seja o gatilho para o remodelamento do tecido adiposo, caracterizado pelo aumento da expressão de Proteína quimioatraente de monócito-1 (MCP-1), a qual tem função de atrair monócitos plasmáticos que se infiltram no tecido (KANDA et al., 2006). Esses monócitos infiltrados podem então assumir um fenótipo clássico do tipo 1 (M1). Essa linhagem de macrófagos agem secretando citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-6, IL-1 β e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que posteriormente tem como função, entre outras, a hidrólise dos estoques de triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres para a circulação. Estudos têm mostrando que caso o insulto, provocado pelo balanço energético positivo,

seja mantido de maneira crônica, poderá haver a intensificação na produção de mediadores inflamatórios que podem extravasar para a circulação, levando ao desenvolvimento da inflamação crônica sistêmica (GALIC et al., 2010; FUJISAKA et al., 2013; TRAYHURN, 2013).

Como já supracitado, o desenvolvimento das comorbidades relacionadas a obesidade, estão fortemente associadas à perpetuação do quadro inflamatório. De fato, a infusão de TNF- α , um mediador inflamatório, em humanos levou ao aumento da fosforilação dos resíduos de serina do receptor de insulina (IR), o qual atenua a transdução do sinal insulínico e, conseqüentemente, a absorção de glicose (HOTAMISLIGIL et al., 1996; PEDERSEN, 2006), sendo peça importante na fisiopatologia da diabetes do tipo 2.

Dessa forma, fica claro que padrões dietéticos ocidentalizados, como o consumo excessivo de ácidos graxos saturados, podem desencadear diversas doenças crônicas através da desregulação do tecido adiposo. Não obstante, recentemente abordagens colocando a desregulação hepática causada por esses tipos de dietas têm ganhado atenção científica, especialmente na gênese da resistência à insulina (BECHMANN et al., 2012).

1.2 Doença hepática gordurosa não-alcoólica (NAFLD)

O excesso de gordura corporal tem sido associado ao aumento de doenças crônicas, como a resistência à insulina, dislipidemias, hipertensão, câncer e NAFLD (VAN GAAL et al., 2006; CHALASANI et al., 2012; LOOMBA & SANYAL, 2013).

NAFLD é uma das comorbidades associadas à obesidade e diabetes altamente prevalente na população mundial (10-24%), independente da faixa etária (ZELBER-SAGI et al., 2006). Sabe-se que dietas ricas em gordura aumentam a chance de acúmulo de lipídios ectópicos no fígado, bem como, e em consequência disso, instalam um processo inflamatório (ROMICS et al., 2004; DELA PEÑA et al., 2005; MICHELOTTI et al., 2013), desregulam o metabolismo hepático (DE SOUZA et al., 2017) e podem induzir fibrose (ASGHARPOUR et al., 2016).

A esteatose hepática induzida pela dieta hiperlipídica desregula completamente o metabolismo hepático. Estudo com modelos animais demonstraram que esse tipo de dieta ocasiona uma maior ativação da via de síntese endógena de lipídeos e colesterol, mediado, principalmente, pela ativação da Proteína de ligação a elemento regulador de esterol (SREBP)-1 e 2, o qual aumenta a expressão de Acetil-CoA carboxilase (ACC) e

Ácido graxo sintase (FAS), e Hidroximetilglutaril-CoA sintase (HMGCS), uma enzima chave na síntese de colesterol (LI et al., 2011; ASGHARPOUR et al., 2016; DE SOUZA et al., 2017; WOODS et al., 2017). Além disso, o acúmulo excessivo de lipídios hepáticos diminui a ativação de proteína quinase ativada por AMP (AMPK), um potente sensor energético relacionado com a oxidação de lipídios e absorção de glicose (THOMSON & WINDER, 2009), e inibidor da ativação de SREBP (LI et al., 2011).

Em relação à inflamação, estudos clássicos (ROMICS et al., 2004; DELA PEÑA et al., 2005) têm demonstrado que a inflamação hepática, causada pelo excesso de acúmulo de lipídios, parece ser regulada pela ativação de NF- κ B, fator de transcrição de genes inflamatórios (LIU et al., 2017) como interleucina-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , e pela atenuação de Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR)- α , o qual está relacionado com a diminuição de genes inflamatórios e modulação positiva da oxidação de ácidos graxos (ROMICS et al., 2004; DELA PEÑA et al., 2005; JIAO et al., 2014).

Além disso, o processo inflamatório exacerbado estimula a migração e ativação de macrófagos no fígado, os quais secretam, juntamente com células estreladas hepáticas (HSC), mediadores pró-inflamatórias e pró-fibróticos, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e Fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (PELLICORO et al., 2014), os quais estimulam a transdiferenciação das HSC para miofibroblastos, resultando na deposição progressiva de componentes de matriz extracelular e início da fibrose hepática (PELLICORO et al., 2014).

1.3. AMPK como guardião do metabolismo energético

A AMPK foi purificada e sequenciada por laboratórios independentes em 1994 (CARLING et al., 1994; DAVIES et al., 1994; MITCHELHILL et al., 1994), mas a história por trás da sua descoberta vem de longa data. Nas décadas de 70 e 80, foi descoberta que a ACC e HMGCS, alvos clássicos da AMPK, eram reguladas negativamente através de fosforilação e diminuição da carga de adenilato (do inglês, *Adenylate charge*), método utilizado para identificar o nível celular de energia, e que o tratamento com fosfatases estabeleciam suas atividades novamente (CARLSON & KIM, 1973; STEINBERG & KEMP, 2009), indícios de que alguma quinase estava controlando a atividade dessas enzimas.

O nome AMPK aparece na literatura pela primeira vez em 1988, proposto pelo grupo do Professor Grahame Hardie (MUNDAY et al., 1988), quando descobriram que a enzima acetyl-CoA carboxylase kinase-3 não era específica à acetyl-CoA carboxylase e era sensível à nucleotídeos, dessa forma, alterou-se seu nome para AMPK. Um ano

depois, o mesmo grupo de pesquisa identificou que tanto a ACC quanto a HMGCS compartilhavam a AMPK como sua principal quinase (CARLING et al., 1989).

Desde então, muitos estudos foram realizados por laboratórios independentes a fim de identificar as funções, estrutura molecular, reguladores e alvos da AMPK. Por exemplo, as subunidades foram descobertas em 1994, a princípio chamadas de p63, p40 e p38 devido ao peso molecular (DAVIES et al., 1994), e posteriormente referidas como α , β , γ , respectivamente (STAPLETON et al., 1996). Apesar da subunidade α ter sido descrita pelo Laboratório do Professor Grahame Hardie em 1994 (DAVIES et al., 1994), foi em 1996 que o pesquisador Bruce Kemp desvendou que haviam duas subunidades distintas, e referiu-se a sua recém descoberta subunidade como $\alpha 1$, e a primigênia como $\alpha 2$ (STAPLETON et al., 1996).

Até a década de 90, sabia-se que a atividade da AMPK poderia ser aumentada de 50 a 100 vezes quando o resíduo de treonina 172 (subunidade α) era fosforilado (HAWLEY et al., 1996), indicando a existência de uma ou mais quinases *upstream*, até então desconhecidas. Apesar de já demonstrado que a CaMKK (do inglês, *calmodulin-dependent protein kinase kinase*) poderia ativar a AMPK, ela não era a quinase que tinha sido purificada previamente de fígados de ratos e conferia esse aumento substancial da atividade da AMPK (HAWLEY et al., 1995). Foi apenas em 2003/2004 que três laboratórios independentes identificaram o complexo LKB1/STRAD/MO25 (do inglês, *Liver kinase B1, Ste20-related adaptor, mouse protein 25*, respectivamente) como uma quinase específica da AMPK (HAWLEY et al., 2003; WOODS et al., 2003; SHAW et al., 2004) (Figura 1).

Figura 1. Regulação da AMPK pelo exercício físico.

Desde então, muito conhecimento foi agregado na literatura acerca desse regulador do metabolismo. Hoje em dia, sabe-se que a AMPK é um serina/treonina quinase heterotrimérica composta pela subunidade catalítica α e as subunidades regulatórias β e γ , a qual é expressa em diversos tipos celulares e detecta as concentrações de AMP e difosfato de adenosina (ADP). Existem várias isoformas para cada subunidade ($\alpha 1/2$, $\beta 1/2$ e $\gamma 1/2/3$), conferindo 12 possíveis complexos diferentes. Essa quinase apresenta como função principal redirecionar o metabolismo celular para o aumento dos processos catabólicos de geração de ATP, como oxidação de gordura, captação de glicose e autofagia, enquanto restringe processos anabólicos que consomem ATP, como síntese

de lipídeos e proteínas, através da fosforilação de diversas proteínas chaves e regulação da expressão gênica (HERZIG & SHAW, 2018) (Figura 2).

Figura 2. Subunidades, isoformas e principais domínios da AMPK.

Sua atividade é governada principalmente pela fosforilação da subunidade α em treonina 172 por proteínas *upstream*, como a LKB1 e CaMKK2 (HAWLEY et al., 1996), mas também pode ocorrer de maneira alostérica mediada por nucleotídeos, ambos em situações em que há estresse energético (e.g. jejum e exercício físico), caracterizadas pelo aumento da razão AMP/ATP (OAKHILL et al., 2011).

A subunidade α é composta por diversos domínios (OVENS et al., 2021), sendo o mais estudado e principal o domínio quinase.

É nesse domínio que está presente “loop” de ativação (do inglês, activation loop) contendo o resíduo de treonina 172, sítio de fosforilação das quinases LKB1 e CaMKK β . Experimentos *in vitro* de mutagênese sítio-dirigida (do inglês, site-directed mutagenesis) mostraram que a mutação da treonina 172 para aspartato (T172D), mantendo a carga negativa característico da fosforilação, resultou em uma AMPK com 40 a 50% de ativação, quando comparada a AMPK *wild-type*. Entretanto, a mutação da treonina 172 para alanina (T172A), mimetizando um resíduo não fosforilado, conferiu uma inativação quase que completa da AMPK, sugerindo que outras modificações pós-traducionais podem estar envolvida com a ativação dessa quinase (STEIN et al., 2000).

Mutagênese sítio-dirigida é uma excelente maneira de descobrir qual função específica de certos aminoácidos e suas modificações pós-traducionais, entretanto, apesar de poder ser expandida para experimentos *in vivo* (e.g. *knock-in*) essa é uma técnica geralmente utilizada *in vitro*. Outra maneira de avaliar a importância da proteína (ou subunidade) é através da sua deleção, que na presente tese chamaremos de *knockout* (KO). Os modelos KO para AMPK α 1/2 começaram a ser desenvolvidos no início dos anos 2000 por pesquisadores Dinamarqueses e Franceses (VIOLLET et al., 2003; JØRGENSEN et al., 2004b). Na época, Jørgensen et al. (2004b) encontraram que a deleção de α 2 mas não α 1, abolia a absorção de glicose muscular induzida por AICAR (análogo de monofosfato de adenosina), mas não pela contração muscular. Enquanto que os experimentos de Viollet et al. (2003) mostraram que os animais AMPK α 2 KO apresentavam uma moderada intolerância à glicose e resistência à insulina.

Além dessa bem conhecida modificação pós-traducional, diversas outras são importantes na ativação da AMPK, as quais foram recentemente revisadas por pesquisadores do Laboratório de Sinalização Metabólica na Austrália (OVENS et al., 2021). Dentre as modificações, se destacam a ligação do AMP na subunidade γ e a miristoilação na porção N-terminal da subunidade β , todas cruciais na ativação da AMPK (OVENS et al., 2021).

A subunidade γ apresenta 3 sítios de ligação de nucleotídeos, denominados de CBS (do inglês, *cystathionine β -synthase*), os sítios 1 e 3 podem permutavelmente se ligar à AMP, ADP e ATP, enquanto que acredita-se que o sítio 4 se liga de forma definitiva à AMP (OVENS et al., 2021). O papel da ligação de AMP e ADP nos CBS1/3/4 foi elegantemente descrito por uma série de experimentos do grupo de pesquisa do pesquisador Jonathan S. Oakhill do Laboratório de Sinalização Metabólica em 2011 (OAKHILL et al., 2011), no qual os autores realizaram uma mutação nos resíduos de Aspartato (por Alanina), referentes à ligação dos nucleotídeos na subunidade γ . Além da clássica ativação da AMPK por AMP, eles encontraram que as mutações nos sítios CBS1 (γ D90A) e CBS3 (γ D245A) diminuíram a ativação da AMPK por ADP, mostrando que a AMPK é uma kinase ativada não apenas por AMP, como o nome sugere, mas também por carga de adenilato. Uma outra função importante da ligação de AMP na subunidade γ é a inibição da desfosforilação do resíduo de Thr172 na subunidade α pelas fosfatases PP2c e PP2a (OVENS et al., 2021).

O modelo KO para γ 3 só foi introduzido na literatura em 2004, por pesquisadores suecos (BARNES et al., 2004). Os pesquisadores encontraram que a ressíntese de glicogênio muscular e a absorção de glicose induzida por AICAR estavam prejudicadas na ausência de γ 3.

Curiosamente, há um grande interesse da indústria farmacêutica em descobrir reguladores da subunidade γ 3, uma vez que ela é expressa exclusivamente na musculatura esquelética. Ovens et al., (observações não publicadas) encontraram que a subunidade γ 3 apresenta, na sua região N-terminal, uma sequência auto inibitória, que quando deletada, aumenta a ativação do complexo AMPK em até 7 vezes. Isso acontece, muito provavelmente pela interação da subunidade γ 3 com o domínio quinase na subunidade α (OVENS et al., [observações não publicadas]). Dessa forma, fármacos podem ser desenvolvidos afim de bloquear a interação entre a subunidade γ 3 e α .

Por fim, outra modificação pós-traducional importante é a miristoilação da subunidade β (OAKHILL et al., 2010). Através de mutagênese sítio-dirigida, pesquisadores encontraram que a miristoilação do resíduo 2 de glicina é essencial na ativação alostérica (AMP) e canônica (quinases) da AMPK (OAKHILL et al., 2010).

Como já abordado, uma vez ativada, a AMPK regula o metabolismo, regulando positivamente os processos catabólicos e negativamente os anabólicos. Mas, apesar de todo o corpo de literatura mostrando os positivos efeitos da AMPK no metabolismo, esses achados nem sempre se replicam em modelos experimentais, especialmente em situações basais. Por exemplo, recentemente o grupo da Prof^a Benoit Viollet elegantemente encontrou que a deleção específica no fígado de AMPK α 1/2 (AMPK α 1^{lox/lox}, α 2^{lox/lox}-Alfp-Cre) não induzia o desenvolvimento de esteatose hepática, quando os animais eram alimentados com dieta padrão (BOUDABA et al., 2018). Entretanto, quando os animais foram desafiados com dieta hiperlipídica por 5 meses a falta da AMPK potencializou os efeitos deletérios no fígado mesmo na presença de ativadores de AMPK (e.g. A-769662), por outro lado, o tratamento com A-769662 regrediu o acúmulo de lipídios no fígado de animais tipo selvagem (WT) para níveis basais (BOUDABA et al., 2018). Esses resultados indicam que estratégias que aumentem a ativação da AMPK são promissoras no tratamento da esteatose hepática.

Nesse contexto, se destaca o exercício físico um já conhecido ativador da AMPK, principalmente no músculo esquelético. Diversos estudos já demonstraram a importância da sinalização intacta da AMPK nas adaptações do exercício físico em diferentes tecidos (KJØBSTED et al., 2018), as quais serão descritas no tópico subsequente.

1.4 Efeito do exercício físico

1.4.1 Musculatura esquelética

1.4.1.1 Ativação dos complexos da AMPK é dependente da intensidade e volume do exercício físico

A musculatura esquelética, assim como outros tecidos, necessitam da utilização da energia proveniente da quebra de ATP para realizar o trabalho mecânico (contração muscular). Em situações de exercício físico, a demanda por ATP pode aumentar em até 1000 vezes, especialmente em atividades de alta intensidade (BAKER et al., 2010), entretanto, a quantidade armazenada de ATP disponível é limitada, dependendo assim, da metabolização de outras moléculas (e.g. glicogênio e triacilglicerol) para obtenção dessa energia, bem como, de processos enzimáticos sensíveis à variação da energia celular.

É nesse panorama que se destaca a AMPK. Como o próprio nome já diz, ela é uma proteína quinase ativada por AMP, e como discutido anteriormente, sensível à carga de adenilato (OAKHILL et al., 2011), ou seja, essa quinase consegue perceber oscilações no estado energético intracelular, e assim, ativar processos catabólicos e desativar os processos anabólicos para obtenção de energia através de uma série de fosforilações (KJØBSTED et al., 2018).

A identificação de que o exercício físico poderia ativar a AMPK é de longa data (WINDER & HARDIE, 1996). Em 1996, Winder & Hardie realizaram uma série de experimentos mostrando, pela primeira vez, a ativação da AMPK pelo exercício físico. Na ocasião, eles colocaram ratos para correr em esteira (21 m/min à 15% de inclinação) e verificaram um aumento de 2,4 vezes na ativação da AMPK, concomitantemente com uma redução na atividade de ACC e 3,7 vezes na concentração da malonil-CoA, identificando a AMPK como principal responsável na inativação da malonil-CoA durante o exercício físico, e dessa forma, promoção da oxidação de ácidos graxos (WINDER & HARDIE, 1996) (Figura 3).

Figura 3. Regulação da oxidação de lipídios pela AMPK.

Desde os primeiros estudos sobre exercício físico e ativação da AMPK na musculatura esquelética, além do interesse em identificar se o exercício físico era capaz de ativar a AMPK em humanos, havia também um grande interesse em relação aos complexos que possivelmente eram ativados e as respectivas funções (KJØBSTED et al., 2018).

Foi em Julho do ano de 2000 que os experimentos de pesquisadores americanos mostraram pela primeira vez que a AMPK era ativada em resposta ao exercício físico no músculo de humanos (FUJII et al., 2000). Biópsias do músculo vasto lateral foram coletadas no repouso, durante o exercício físico (20 e 60 minutos) e 30 minutos após o esforço. O exercício físico foi realizado em ciclo ergômetro e as intensidades do exercício físico foram fixadas em 50 e 70% do consumo máximo de oxigênio (VO₂máx). Na intensidade de 70% do VO₂máx, os autores encontraram que a AMPK α 2, mas não a α 1, estava com sua atividade aumentada durante o exercício físico (20 e 60 minutos) e se mantinha elevada após 30 minutos de descanso, comportamento também encontrado em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (T2D) (MUSI et al., 2001). Interessantemente, o aumento na atividade da AMPK α 2 estava correlacionado com a diminuição na

quantidade de glicogênio muscular em indivíduos saudáveis e com T2D, fato que não ocorreu na intensidade inferior (FUJII et al., 2000; MUSI et al., 2001).

Similarmente, em outubro do mesmo ano, Wojtaszewski et al. (2000) encontraram um aumento de 3 a 4 vezes na ativação da AMPK α 2 à 75% do VO₂máx, enquanto que nenhuma diferença em relação ao basal foi encontrado para a intensidade de 50% do VO₂máx. A atividade da AMPK α 2 foi completamente restaurada 3 horas após o exercício físico. Interessantemente, sessões agudas de exercício físico à baixa intensidade (45% do VO₂máx) também parecem ativar a AMPK α 2 quando realizada até a exaustão (~3,5 horas) (WOJTASZEWSKI et al., 2000). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que os complexos da AMPK compondo a subunidade α 2 são os principais ativados durante o exercício físico na musculatura esquelética.

Outro ponto importante é que apenas três dos 12 complexos possíveis da AMPK são significativamente expressos no músculo esquelético, α 1/ β 2/ γ 1, α 2/ β 2/ γ 1 e α 2/ β 2/ γ 3, sendo o último, como já supracitado, de grande importância uma vez que é específico da musculatura esquelética (WOJTASZEWSKI et al., 2005). Nesse contexto, Birk, Wojtaszewski (2006) mostraram que apenas o heterotrímero α 2/ β 2/ γ 3 é ativado durante o exercício de alta intensidade, enquanto que a atividade enzimática dos demais heterotrímeros não se modificaram ou até diminuíram durante o exercício físico, mostrando que os principais efeitos do exercício físico no músculo são dependentes de subunidade γ 3. Similarmente, Treebak et al. (2007) encontraram que apenas o heterotrímero α 2/ β 2/ γ 1 era ativado em três situações de esforço máximo. Apesar disso, outros complexos também são ativados de maneira significativa durante o exercício físico, como o α 1/ β 2/ γ 1 e α 2/ β 2/ γ 1, entretanto, apenas em intensidades inferiores e de longa duração (TREEBAK et al., 2007).

1.4.1.2 Efeitos da ativação da AMPK no músculo esquelético

Em relação aos efeitos da ativação da AMPK no músculo, nos primórdios sabia-se que o tratamento farmacológico com AICAR (0,5 mM até 2,0 mM) ativava AMPK, inibia ACC, aumentava oxidação de lipídios, capacidade oxidativa e transporte de glicose (MERRILL et al., 1997), indicativos promissores de que o exercício físico atuava nesses desfechos.

Posteriormente nos anos 2000, foi descoberto que a AMPK inibia a enzima glicogênio sintase no músculo através da fosforilação do resíduo Ser7 no sitio 2 da

enzima, e dessa forma, prejudicava a glicogênese (JØRGENSEN et al., 2004a), e também inibia a síntese de proteínas através da regulação negativa da mTOR (BOLSTER et al., 2002).

Aliás, foi nesse período que as grandes descobertas acerca da AMPK foram realizadas. Por exemplo, o primeiro estudo mostrando que o tratamento farmacológica crônico com AICAR (4 semanas) era capaz de aumentar a expressão de enzimas mitocondriais, como a citrato sintase, succinato desidrogenase e citocromo C, bem como, marcadores de melhora do controle glicêmico, como o transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) e hexoquinase na musculatura esquelética (WINDER et al., 2000), resultados esses replicados em outros experimentos independentes (BERGERON et al., 2001; ZONG et al., 2002).

A respeito do processo de biogênese mitocondrial, a maioria dos achados na literatura descrevem a AMPK como sendo importante nesse processo através da fosforilação de coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 α) (JÄGER et al., 2007; KJØBSTED et al., 2018). De fato, o PGC-1 α apresenta em sua composição de aminoácidos duas sequências consenso da AMPK, localizado em torno da Thr177 e da Ser538, e já foi demonstrado pelo grupo do Profº Bruce Spiegelmann que a AMPK α 2 interage fisicamente com o PGC-1 α , em ensaios co-imunoprecipitação, a fosforilando e ativando (JÄGER et al., 2007). No entanto, ensaios com animais KO para PGC-1 α mostraram que, diferentemente do senso comum, o PGC-1 α é crucial apenas no processo de angiogênese mediado pelo treinamento aeróbio, enquanto que outras função atribuídas à essa proteína apresentaram respostas similares entre os animais KO e WT (LEICK et al., 2008; GENG et al., 2010). Dessa forma, hipotetiza-se que a AMPK module a densidade mitocondrial por outras vias independentes de PGC-1 α , como é o caso da sirtuina-1 (SIRT-1) (CANTÓ et al., 2010; EGAN & ZIERATH, 2013). Interessantemente, a AMPK também parece ser essencial no processo de angiogênese muscular (TANNER et al., 2013; LI et al., 2019), possivelmente indicando uma via AMPK-PGC-1 α no músculo.

Embora diversos estudos de ganho e perda de função tenham sido publicados nos últimos anos mostrando os potenciais efeitos da AMPK no músculo, esses achados ainda são confusos. Por exemplo, animais AMPK β 1 β 2 KO dependem da oxidação de lipídios para suprir a necessidade energética durante o exercício físico, uma vez que apresentam prejuízo na absorção de glicose (O'NEILL et al., 2011). Entretanto, animais LKB1 KO, a quinase *upstream* responsável pela ativação da AMPK, apresentam diminuída oxidação

de lipídios durante o exercício, e animais com depleção de AMPK específica no músculo esquelético (mdKO) apresentam o mesmo fenótipo de diminuição da oxidação de lipídios, adicionalmente à função normal de absorção de glicose (FENTZ et al., 2015). Além disso, experimentos *ex-vivo* com contração muscular encontraram pouca ou nenhuma influência da ausência da AMPK na absorção de glicose no músculo esquelético (KJØBSTED et al., 2018).

Dessa forma, fica claro que os efeitos da AMPK no músculo são confusos e controversos. Esses achados, geralmente contraditórios, podem ser estendidos para outras funções, como controle da expressão gênica, biogênese mitocondrial, inflamação, reparação tecidual, sensibilidade à insulina e etc, uma vez que diferentes modelos experimentais (e.g. KO total vs muscular), intervenções dietéticas e de exercício físico (e.g. baixa/alta intensidade e volume) podem gerar adaptações diferentes. Não obstante, a ativação da AMPK, tanto farmacológica quanto por estresse energético, parece de fato influenciar todos esses desfechos, entretanto, os achados aqui descritos mostram que essa quinase é apenas parcialmente requerida nesses processos (e.g. oxidação de lipídios e absorção de glicose), uma vez que a sua ausência na musculatura esquelética não inibiu esses processos. Uma das explicações é que, provavelmente, existem outras vias metabólicas que conseguem suprir essa deficiência.

Contudo cabe-se ressaltar que modelos experimentais com deleção específica de alguma subunidade da AMPK no músculo esquelético, mdKO, são considerados superiores aos demais, pois geram resultados sem compensações de outros tecidos (ou com menos) e, como o próprio nome já diz, específica para o tecido em questão. Quando analisado os achados desses modelos experimentais, fica claro a importância da AMPK muscular nas adaptações relacionadas à capacidade e potência aeróbia, biogênese mitocondrial e oxidação fosforilativa (OXPHOS), sendo assim, crucial nas adaptações ao exercício de endurance (O'NEILL et al., 2011; LANTIER et al., 2014; FENTZ et al., 2015; LANTIER et al., 2020).

1.4.1.3 Regulação das miocinas pela AMPK

Outro ponto importante no que se diz respeito à musculatura esquelética, é a produção de miocinas durante e após uma sessão aguda de exercício físico. Atualmente, entende-se que o músculo esquelético é um órgão endócrino e que ele se comunica com outros tecidos através dessas miocinas, promovendo os principais efeitos protetivos e

terapêuticos do exercício físico em relação à desordens metabólicas (SEVERINSEN & PEDERSEN, 2020) (Figura 4).

Figura 4. Comunicação músculo-órgãos.

Os estudos iniciais sobre o assunto foram realizados pelo grupo da Prof^a Bente Klarlund Pedersen no final dos anos 90, no qual identificaram que as concentrações de IL-6 aumentavam em até 100 vezes imediatamente após uma maratona (OSTROWSKI et al., 1998), desfecho esse confirmado anos depois (STEENSBERG et al., 2000). Desde então, muita informação se acumulou na literatura demonstrando que a IL-6 secretada pela musculatura esquelética durante o exercício físico apresenta diversos efeitos metabólicos e imunológicos em diferentes órgãos (SEVERINSEN & PEDERSEN, 2020).

Em relação à AMPK, as evidências sugerem que exista uma correlação entre a secreção de IL-6 e a ativação de AMPK durante o exercício físico (MACDONALD et al., 2003). Entretanto, há muita divergência ainda na literatura acerca desse desfecho. Por exemplo, Weigert et al. (2007) encontraram que o tratamento com AICAR aumentava a expressão gênica e secreção muscular de IL-6, enquanto que Glund et al. (2009) mostraram profunda diminuição da expressão gênica e secreção de IL-6 na presença de AICAR de maneira independente de AMPK. Por outro lado, Lauritzen et al. (2013) encontraram aumento na secreção de IL-6 estimulada por AICAR de maneira dependente da AMPK, entretanto a secreção dessa miocina mediada pela contração muscular era independente da AMPK. E por fim, animais AMPK KO de corpo todo e específico do músculo esquelético apresentam aumentada secreção de IL-6 (GLUND et al., 2009; LANTIER et al., 2014), o que pode ser explicado pelo baixo nível de glicogênio muscular nesses genótipos (STEENSBERG et al., 2000; KELLER et al., 2001; MACDONALD et al., 2003). Por conseguinte, fica evidente a dificuldade em estabelecer um padrão entre AMPK e IL-6.

Outra molécula de grande interesse é a adiponectina. A adiponectina foi inicialmente identificada como uma proteína produzida apenas pelo tecido adiposo, tendo funções anti-inflamatórias e metabólicas, como a oxidação da glicose e dos ácidos graxos (HOSOOKA et al., 2008). No entanto, embora quase toda a adiponectina seja secretada pelos adipócitos, as fibras musculares esqueléticas também podem secretar essa proteína. Estudos prévios observaram que as concentrações de adiponectina aumentam após exercícios agudos, principalmente aeróbios (SALANS et al., 1971; KANDA et al., 2006; TRAYHURN, 2013). De fato, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a adiponectina

pode ser secretada pelo músculo esquelético (GALIC et al., 2010; FUJISAKA et al., 2013), exercendo funções autócrinas e parácrinas, como sensibilização à insulina e captação de glicose (HOTAMISLIGIL et al., 1996), através, principalmente, do seu receptor do tipo 1 (AdipoR1), o qual é conhecido por culminar na ativação da AMPK (YAMAUCHI et al., 2014). Dessa forma, muito provavelmente existe uma via Adiponectina/AdipoR1/AMPK na musculatura esquelética.

Existem outras miocinas menos estudadas com possível relação com a AMPK. Embora escassos, estudos sugerem que a expressão de IL-15, miocina atribuída à hipertrofia e envelhecimento da pele (SEVERINSEN & PEDERSEN, 2020), é diminuída tanto em animais AMPK α 2 dominante negativo” (enzima não funcional) (ABBOTT et al., 2012), quanto em animais AMPK β 1 β 2 KO específico na musculatura esquelética (CRANE et al., 2015). Já para o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), apenas um estudo mostrou que o exercício físico promove a liberação dessa miocina, e ela age de maneira autócrina e parácrina na musculatura esquelética estimulando a oxidação de lipídios de maneira dependente à AMPK (MATTHEWS et al., 2009). Por fim, um elegante estudo recém publicado mostrou que a IL-13 estimula positivamente a biogênese mitocondrial, capacidade aeróbia, oxidação de lipídios e absorção de glicose na musculatura esquelética através da via da Transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT)-3. No entanto, os autores não avaliaram a expressão e atividade da AMPK nesse estudo, apesar de todos os indícios levarem a acreditar que poderia existir uma participação da AMPK nos desfechos observados (KNUDSEN et al., 2020).

1.4.2 Fígado

Como já supracitado, a descoberta da AMPK foi realizado por 3 laboratórios independentes no ano de 1994 (CARLING et al., 1994; DAVIES et al., 1994; MITCHELHILL et al., 1994). Carling et al. (1994) e (DAVIES et al., 1994) isolaram e purificam a AMPK a partir de extrato de fígado de rato, enquanto que Mitchelhill et al. (1994) utilizaram amostras de fígados de porcos, sendo assim, as primeiras funções descritas da AMPK, como a fosforilação e inibição da ACC e HMGCS, foram realizadas no fígado.

Desde então, muito conhecimento foi acumulado na literatura sobre as funções da AMPK no fígado. Entretanto, os conceitos discutidos no tópico anterior também se equivalem aqui, muitos estudos utilizaram diferentes desenhos e modelos experimentais, assim como tratamentos, gerando resultados geralmente por vezes contraditórios.

Esse desfecho pode ser atribuído à complexidade em inativar a AMPK no fígado (e em outros tecidos). No fígado, o principal complexo existente é o $\alpha 1\beta 1\gamma 1$, mas pode-se encontrar a expressão de $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ e $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ em espectrometria de massa (WU et al., 2013). Recentemente, Boudaba et al. (2018) encontraram expressão significativa de $\gamma 2$ nos fígados de camundongos, adicionando mais uma peça nesse quebra-cabeça. Dessa forma, atualmente acredita-se que possa existir até seis diferentes complexos de AMPK no fígado, dificultando sua deleção completa.

Em relação à subunidade α , estudos clássicos encontraram uma expressão similar entre a $\alpha 1$ e $\alpha 2$ em ratos (WOODS et al., 1996; CHEUNG et al., 2000). Interessantemente, utilizando espectrometria de massa Wu et al. (2013) encontraram a expressão de ambas as subunidades α em roedores, entretanto em humanos foi encontrado apenas a $\alpha 1$. O KO da $\alpha 2$ diminui a fosforilação de AMPK (Thr172) em 60%, no entanto, em apenas 25% a fosforilação da ACC (Ser79) mostrando ativação compensatória da subunidade $\alpha 1$ (ANDREELLI et al., 2006).

Ambas as subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ são expressas no fígado (BOUDABA et al., 2018) e o KO da $\beta 1$ causa uma redução de 90% de atividade da AMPK no fígado, embora os efeitos clássicos da AMPK, como controle glicêmico e diminuição da expressão de genes gliconeogênicos, não terem sido observados (DZAMKO et al., 2010), podendo indicar uma participação importante da subunidade $\beta 2$. De fato, um estudo clássico de proteômica mostrou que a subunidade $\beta 2$ é a predominante no fígado de células humanas saudáveis (WU et al., 2013).

Em relação à subunidade γ , recentemente Boudaba et al. (2018) demonstraram as subunidades $\gamma 1$ e $\gamma 2$ são igualmente expressas no fígado, apesar de classicamente ter sido demonstrado uma predominância de $\gamma 1$ (WU et al., 2013).

Animais AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ duplo KO são inviáveis pois essa deleção causa letalidade embrionária, aproximadamente, no 10º dia (VIOLLET et al., 2009a; UM et al., 2010). Dessa forma, para investigar o real efeito da inativação da AMPK no fígado seria necessário a combinação de animais AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ floxeados ($^{lox/lox}$) e AlbCre (α -fetoproteína) (KELLENDONK et al., 2000) ou AlbCre (albumina) (POSTIC et al., 1999), o que demonstra a complexidade dos cruzamentos entre os genótipos e o longo tempo necessário para implementá-los.

Não obstante, Boudaba et al. (2018) desenvolveram esse modelo de deleção da AMPK α 1/2 específica no fígado (AMPK α 1^{lox/lox}, α 2^{lox/lox}-Alfp-Cre). Nesse estudo, os autores encontraram que a inativação hepática da AMPK não ocasionou o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (e.g. esteatose hepática) quando os animais foram alimentados com dieta padrão. Esse desfecho não se repetiu em animais alimentado com HFD. Nesse modelo experimental, 5 meses de dieta causou exacerbada esteatose hepática, devido à diminuição da oxidação de lipídios e aumento na lipogênese.

De fato, o laboratório da Prof^a Benoit Viollet é um dos únicos que domina esse modelo experimental, e é considerado um dos principais responsáveis pelas descobertas das funções da AMPK no fígado. Em outro brilhante estudo, Viollet et al. (2009b) encontraram que a deleção hepática de AMPK α 1/2 prejudicou a respiração celular e controle energético através da diminuição de ATP, da atividade dos complexos mitocondriais (COXIV, COXI, citocromo C e ATPase) e da expressão de PGC-1 α e TFAM (Fator de transcrição mitocondrial A). Além disso, o efeito hipoglicemiantes da AICAR foi quase 60% menor nos animais AMPK α 1/2^{lox/lox}-Alfp-Cre, indicando participação importante da AMPK hepática na homeostase glicêmica. O restante do efeito hipoglicemiante desse fármaco parece ser mediado pela AMPK muscular (MU et al., 2001), enquanto que o tecido adiposo não participa desse desfecho (CHOI et al., 2019).

Corroborando esses achados, Wang et al. (2019) utilizando animais AMPK α 1/ α 2-Alb-cre encontraram que a AMPK hepática era importante na manutenção da glicose plasmática, muito provavelmente devido a sua participação na inibição da via de gliconeogênese, e na manutenção da saúde mitocondrial, uma vez que os animais AMPK α 1/ α 2-Alb-cre apresentaram diminuída massa e função mitocondrial em relação aos animais controles. Desfechos esses que corroboram os de Andreelli et al. (2006), no qual foi observado em animais AMPK α 2-Alfp-cre severa intolerância à glicose e hiperglicemia em jejum, devido ao aumento da produção hepática de glicose mediado pela elevada atividade enzimática de Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase).

Como já demonstrado, em situações basais a falta de AMPK pouco afeta as funções hepáticas, a não ser a produção endógena de glicose. Em contrapartida, diversos estudo in vitro já demonstraram que a ativação da AMPK poderia ser benéfica ao tecido hepático em situações de sobrecarga energética (e.g. dieta com alto teor de lipídios e frutose). Nesse sentido, o desenvolvimento de modelos experimentais que mimetizem a

ativação da AMPK são importantes para o entendimento da sua função nessas situações. Um modelo experimental clássico é a ativação constitutiva de AMPK, a qual mimetiza tanto uma ativação farmacológica quanto por estresse energético (e.g. dietas restritivas e exercício físico).

Nesses modelos experimentais foram encontrados que a ativação constitutiva de AMPK específica no fígado (L-AMPK^{CA}), confere diversos benefícios à nível corporal, como diminuição da glicose e melhora da sensibilidade à insulina (FORETZ et al., 2018; GARCIA et al., 2019), e a nível hepático, como diminuição da esteatose hepática, inflamação e marcadores de fibrose (FORETZ et al., 2018; GARCIA et al., 2019), todos importantes clinicamente no tratamento da NAFLD. Do ponto de vista celular, animais L-AMPK^{CA} apresentam a via da lipogênese prejudica visto que a expressão, e possivelmente atividade nuclear, da SREBP-1 e da proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos (ChREBP-1) apresentam-se diminuídas, colimando numa regulação negativa da expressão de enzimas chaves na lipogênese (e.g. FAS e ACC1/2) (FORETZ et al., 2005). Além disso, estudos com esse modelo animal encontram aumentada oxidação de lipídios hepáticos (FORETZ et al., 2005; FORETZ et al., 2018; GARCIA et al., 2019).

Tomados em conjunto, fica claro a importância da AMPK hepática, principalmente no controle glicêmico, mas também na regulação da taxa de oxidação e síntese de lipídios, todos envolvidos na gênese da NAFLD. De fato, como já discutido, a ativação farmacológica e genética da AMPK resulta em uma diminuição do acúmulo de lipídios (esteatose hepática), marco do desenvolvimento de NAFLD (VIOLLET et al., 2006; FORETZ & VIOLLET, 2011; DE SOUZA et al., 2017; ZHAO et al., 2020).

No entanto, são escassos os estudos utilizando exercício físico como estressor energético hepático. É sabido que durante o exercício físico agudo há um aumento das concentrações de AMP dependente da intensidade, podendo subir em até 300% sua concentração, enquanto que a carga de adelinato (ou carga de energia) pode diminuir em até 50% (CAMACHO et al., 2006), desfechos que sugerem a ativação da AMPK. Nosso grupo demonstrou recentemente uma ativação significativa de AMPK no fígado de animais treinados, mesmo sob regime HFD (DINIZ et al., 2021), resultados que corroboram com achados prévios (CHO et al., 2014; CHO et al., 2015), indicando que o exercício físico pode ser considerado como um potencial ativado hepático de AMPK.

2. OBJETIVO

Analisar a o papel da AMPK no músculo esquelético e fígado durante o exercício agudo e crônico em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta padrão e hiperlipídica.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Analisar a participação da adiponectina na ativação e expressão de AMPK e IL-6 no músculo esquelético após sessão aguda de exercício físico em esteira rolante.

2.1.2 Analisar a participação da adiponectina na inflamação muscular 2 e 24 horas após uma sessão aguda de exercício físico em esteira rolante.

2.1.3 Analisar o efeito de 12 semanas de treinamento aeróbio à 60% da velocidade máxima na composição corporal, controle glicêmico, marcadores de esteatose hepática e inflamação de animais C57BL/6 obesos.

2.1.4 Investigar os possíveis mediadores das alterações hepáticas na inflamação e esteatose mediada por dieta rica em lipídios.

3. MÉTODOS

3.1 Protocolos experimentais

Todos os procedimentos desse estudo seguiram os princípios éticos de experimentação animal e foram aprovados (12/08/2016) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo 46/2016).

3.1.1 Protocolo experimental 1 – O papel da adiponectina como miocina na resposta metabólica e inflamatória do exercício agudo de moderada intensidade na musculatura esquelética

Camundongos machos WT e adiponectina *knockout* (AdKO) entre 8-10 semanas foram divididos em 2 grupos: exercício e sedentário. O grupo exercício foi novamente dividido em 2 grupos de acordo com o tempo de eutanásia pós-exercício agudo: exercício 2 e 24 horas. Cada grupo exercício foi equiparado com um grupo controle (sedentário 2 e 24 horas), devido a possíveis alterações circadianas (GAMBLE et al., 2014) (**Figura 5**). Todos os animais receberam dieta padrão (SD).

Figura 5. Desenho experimental.

3.1.1.1 Protocolo de teste máximo

Todos os camundongos foram aclimatados para correr em uma esteira motorizada com uma grade elétrica na parte traseira do tapete rolante ao longo de 4 dias antes da realização de um teste incremental de desempenho máximo (MAS). Na adaptação, os animais correram por 10 minutos a uma intensidade de 10 metros por minutos (m/min). Para o teste máximo propriamente dito, os animais realizaram aquecimento, caracterizado por 5 minutos na velocidade de 10 m/min, com início do teste a partir do sexto minuto, aumentando a velocidade em 3 m/min a cada minuto, até a exaustão voluntária, definida como uma incapacidade de manter a velocidade de corrida e de contato repetido com a grade elétrica. Após a exaustão os animais foram imediatamente retirados da esteira e recolocados em suas gaiolas.

3.1.1.2 Protocolo de exercício agudo

Os camundongos dos grupos exercícios foram expostos à um exercício de corrida na esteira de moderada intensidade por 60 minutos com inclinação de 0° graus. A velocidade da esteira iniciou-se em 10 m/min durante 10 minutos, e foi aumentada em 1 m/min até chegar a 60% da velocidade máxima. As sessões de exercícios foram iniciadas às 11:00 e 12:00 am.

3.1.1.3 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados 2 e 24 horas após a sessão de exercício agudo com seus respectivos grupos controles sedentários. Todos os grupos estavam em 6 horas de jejum durante o procedimento. A massa corporal dos camundongos foi aferida e seus tecidos foram pesados e coletados (tecido adiposo, subcutâneo e retroperitoneal, fígado, sóleo e gastrocnêmio). O índice de adiposidade foi calculado pela soma dos tecidos adiposos brancos (epididimal, subcutâneo e retroperitoneal) dividido pela massa corporal $\times 100$ e expresso como porcentagem de adiposidade (JEYAKUMAR et al., 2006).

3.1.2 Protocolo experimental 2 - O papel do treinamento aeróbio na regulação do metabolismo e inflamação hepática em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios.

Foram utilizados camundongos machos WT, os quais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12h (luz acendidas às 06:00) e temperatura de 23°C. Os animais iniciaram o protocolo com, aproximadamente, 8 semanas de idade e foram separados em 3 grupos experimentais: grupo dieta padrão sedentário (SD, 9% de gordura, 15% de proteína e 76% de carboidrato), dieta rica em lipídeos sedentário (HFD, 59% de gordura, 15% de proteína e 26% de carboidrato), e dieta rica em lipídeo e treinamento aeróbio

(HFD+T, 60% MAS) (Figura 16A-B). As dietas foram oferecidas *ad libitum* por 12 semanas. Durante o período de intervenção, o peso e a ingestão alimentar foram mensurados uma vez por semana.

3.1.2.1 Protocolo de teste máximo e de treinamento aeróbio

Todos os camundongos foram aclimatados para correr em uma esteira motorizada com uma grade elétrica na parte traseira do tapete rolante ao longo de 4 dias antes da realização do MAS. Na adaptação, os animais correram por 10 minutos a uma intensidade de 10 m/min. O teste máximo começou à 6 m/min sem inclinação e a velocidade foi aumentada 3 m/min a cada 3 minutos até a exaustão voluntária. O teste fornece a velocidade máxima.

Baseado no teste descrito, foi calculada a intensidade correspondente à 60% da velocidade máxima atingida no teste (FERREIRA et al., 2007) e a média foi utilizada para estabelecer a velocidade de treinamento para os camundongos. O treinamento teve duração de 8 semanas, cada sessão de treino durou 60 minutos e ele foi realizado 5 vezes por semana. Na quarta semana de treinamento, a velocidade da esteira foi ajustada em 5%. Optamos por não reavaliar a MAS no meio do protocolo, pois experiências prévias do laboratório mostraram que isso aumenta o estresse nos animais.

3.1.2.2 Eutanásia

Após as 12 semanas, os animais foram submetidos a jejum durante 6 horas antes de serem eutanasiados por decapitação para a coleta de amostras de sangue e de tecidos. A eutanásia ocorreu 48 horas após a última sessão de treinamento aeróbio. Para tal, os animais foram previamente anestesiados com isoflurano. Foram cuidadosamente retirados os músculos gastrocnêmio e sóleo, o fígado, bem como os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e subcutâneo e, após os procedimentos de dissecação os tecidos e órgãos foram lavados em tampão Salino-Fosfato (PBS, pH 7,4) e pesados, sendo posteriormente mantidos a -80°C (fígado, gastrocnêmio, tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal). O índice de adiposidade foi calculado pela soma dos tecidos adiposos brancos (epididimal, subcutâneo e retroperitoneal) dividido pela massa corporal $\times 100$ e expresso como porcentagem de adiposidade (JEYAKUMAR et al., 2006).

3.2 Avaliação de parâmetros plasmáticos

O sangue coletado em tubos plásticos foi centrifugado (3000 rpm, 12 min, 4°C) para a extração do soro. As concentrações de colesterol total, triglicilglicerol, glicose e lactato, no soro, foram determinadas por kits enzimáticos de acordo com instruções dos

fabricantes (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil). O ácido graxo livre não-esterificado (NEFA) no soro foi analisado utilizando o kit NEFA-kit-U (Wako Chemical GmbH, Neuss, Alemanha).

3.3 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Para a construção da curva glicêmica, os animais em jejum prévio de 6 horas receberam uma dose de glicose (2g/kg peso corporal) intraperitonealmente. Realizou-se a determinação da glicemia capilar caudal, através de glicosímetro *Accu-Chek Active*® (ROCHE®, São Paulo, SP, Brazil) em diferentes momentos: 0 (basal), 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de glicose.

3.4 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Amostras pesando 80-100 mg de fígado, gastrocnêmio, tecido adiposo subcutâneo e retroperitoenal foram cuidadosamente homogeneizados em tampão de extração (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM de NaCl e 1 mM de ortovanadato de sódio) contendo 10 ug / ml de inibidor de protease cocktail (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, Missouri, EUA). As amostras foram centrifugadas a 13.000 g, a 4° C, por 30 min e os sobrenadantes submetidos à quantificação proteica pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad ®, Hercules, CA, EUA), e em seguida, utilizados para determinar os níveis proteicos de adiponectina, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1, VEGF e TGF- β por ELISA (DuoSet ELISA ®, R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

3.5 Determinação da expressão proteica

Amostra de fígado, gastrocnêmio e tecido adiposo subcutâneo foram cuidadosamente homogeneizados em tampão de extração (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM de NaCl e 1 mM de ortovanadato de sódio) contendo 10 ug/ml de inibidor de protease cocktail (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, Missouri, EUA). As amostras foram centrifugadas a 13.000 g, a 4° C, por 30 min e os sobrenadantes submetidos à quantificação proteica pelo método de Bradford (1976), usando curva de albumina como padrão.

A análise por Western Blotting foi realizada segundo Towbin et al. (1979). Alíquotas de cada amostra, com a mesma concentração de proteínas totais (30 a 50 μ g), foram tratadas em tampão de amostra (10x) de acordo com o método descrito por Laemmli (1970) e submetidas à electroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) (SHAPIRO et al., 1967). Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, por 45 min a 25 V. Estas foram

incubadas em solução basal acrescida de 3% de leite desnatado overnight à 4°C, após o bloqueio, com o anticorpo para adiponectina (1:1000), NF-κB p65 total (1:1000), p-NF-κB p65 (Ser536) (1:1000), p-IRS-1 (Ser302) (1:500) (Substrato do receptor de insulina-1), AMPK total (1:1000), p-AMPK (Thr172) (1:1000), PPAR-γ (1:1000), ACC total (1:1000) e p-ACC (Ser79) (1:1000) da Cell signaling (Cell signaling, USA) e PPAR-α (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Também foi utilizado o anticorpo Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (ab110413) para avaliar a expressão dos complexos mitocondriais. As membranas foram lavadas (3 x 10 min) e submetidas à incubação com o segundo anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase, por 1 hora, em solução basal contendo leite a 1%, à temperatura ambiente. Após nova sessão de lavagens (3 x 10 min), as membranas foram incubadas com o substrato para peroxidase (SignalFire™ Plus ECL reagent, Cell signaling) por 1 min e posteriormente reveladas em fotodocumentador (Amersham™ Imager 680, GE Healthcare Life Sciences). A intensidade das bandas foram quantificadas por densitometria (ImageJ, 1.50i, National Institutes of Health) e normalizadas por α-Actin (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) ou Ponceau (FORTES et al., 2016).

3.6 Histologia

Amostras de fígado e tecido adiposo foram imediatamente imersa em solução de PBS contendo paraformaldeído (4% (p/v), pH 7,4, 4°C) durante 24 horas. Após este período, as fatias foram lavadas várias vezes em etanol 70% e armazenadas em álcool 70%. Posteriormente, as fatias foram submetidas a sucessivos banhos em etanol 70%, 90%, 95%, até o etanol absoluto, com intervalos de 30 minutos entre cada banho, seguido por um banho em mistura homogênea de etanol e xilol por 30 minutos e três banhos de xilol com duração de 20 minutos cada. Por fim, as fatias foram impregnadas em paraplastPlus® (Sigma, São Paulo, SP, Brasil) (58°C, por 3 horas) e foram emblocadas em Tissue Cassetes (Fisher Scientific, São Paulo, SP, Brasil). Os blocos foram submetidos à microtomia, com cortes consecutivos de 5,0 μm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas previamente cobertas com polilisina (Sigma, São Paulo, SP, Brasil). As lâminas com os cortes histológicos foram desparafinizadas com xilol, hidratadas em banhos decrescentes de etanol (100 a 70%) e água destilada.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e picrossírius. A análise da morfologia das células foi realizada utilizando imagens digitalizadas com aumento de 20-40x. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio óptico modelo ICS

Standard 25 (CarZeiss, Brasil) com câmera acoplada modelo AxioCam HRC (CarZeiss, Brasil). Para cada corte histológico foram capturadas 5 imagens coradas com HE. Para a quantificação das fibras de colágeno, as imagens do Picrosirius foram capturadas em um microscópio Nikon DS-Ri7.

Para análise histológica do músculo gastrocnêmio, foi coletado e fixado, sob disco de cortiça, com OCT (Tissue-Tek®, Sakura® Finetek, CA, EUA) e Tragacanth (Sigma Aldrich, MO, EUA) em posição vertical. Em seguida, foram congelados em nitrogênio líquido. Cortes transversais (10 µm de espessura) foram cortados em um criostato, montados em lâminas quentes StarFrost (Knittel Glass®, Braunschweig, Alemanha) e corados com HE para descrever a morfologia, Sudan Black (SB) para avaliar lipídios deposição e ácido periódico (PAS) para visualizar depósitos de glicogênio. As imagens foram capturadas em um microscópio Nikon Eclipse E800. O software ImageJ (ImageJ, 1.50i, National Institutes of Health) foi utilizado para quantificar a intensidade média das médias de SB e PAS.

3.7 NAFLD e esteato-hepatite não alcoólica (NASH) escore

A caracterização de NAFLD/NASH foi realizada de acordo com [Liang et al. \(2014\)](#), utilizando a coloração HE dos cortes histológicos do fígado ([Tabela 1](#)). Brevemente, o score para NAFLD leva em consideração 3 parâmetros: esteatose microvesicular e macrovesicular e hipertrofia dos hepatócitos. Os scores variam de 0 a 3, de acordo com a porcentagem de campo afetado. Para identificação de NASH foi utilizado a presença ou ausência de agregados inflamatórios juntamente com NAFLD. Para esse parâmetro foi considerado um grupo ≥ 5 células que não estivessem dispostas em linha. Os scores variam de 0 a 3 de acordo com a quantidade de agregados encontrados (0 = < 3 agregados em 5 campos e 3 = 10 focos em 5 campos).

Tabela 1. Classificação de NAFLD.

Características histológicas	Escore			
	0	1	2	3
Esteatose:				
Macrovesicular	<5%	5-33%	33-66%	>66%
Microvesicular	<5%	5-33%	33-66%	>66%
Hipertrofia	<5%	5-33%	33-66%	>66%
Inflamação				
Nº de agregados inflamatório/campo*	0,5	0,5-1,0	1,0-2,0	>2,0

*5 campos analisados por animal

3.8 Folch

A extração de lipídeos do músculo gastrocnêmio e do fígado foi realizada pelo método de Folch, Sakura (1976). Resumidamente, clorofórmio e metanol na proporção de 2: 1 (v / v) foram adicionados à alíquota de amostra colocada num tubo de vidro e homogeneizados. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 min. Recolheu-se a fase orgânica inferior e adicionou-se 2 ml de água. Esta mistura foi centrifugada a 1.500 rpm durante 5 min. Em seguida, os lipídeos extraídos foram coletados e secos naturalmente. Em seguida as amostras foram reconstituídas em 300 ml de Triton 3% para armazenamento. As concentrações de triacilglicerol e colesterol total foram analisadas pelo método colorimétrico (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.9 Isolamento de RNA, transcrição reversa e qRT-PCR

O RNA total do fígado e gastrocnêmio foi extraído com reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), de acordo com o método descrito por Chomczynski, Sacchi (1987). A transcrição reversa para cDNA foi realizada usando o kit de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA). A expressão do gene foi avaliada por RT-PCR de acordo com Higuchi et al. (1992), usando Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) como corante fluorescente. As sequências de primer são apresentadas na **Tabela 2**. A quantificação da expressão gênica foi realizada usando o gene Hprt1 como controle interno para o fígado (MAHONEY et al., 2004) e GAPDH (GU et al., 2014) para gastrocnêmio, conforme descrito anteriormente por Liu, Saint (2002).

Tabela 2. Sequências dos primers do RT-PCR

Gene	Left primer	Right primer
Acox	5' TACGTGCAGCCAGATTGGTA 3'	5' ACGCCACTTCCTTGCTCTT 3'
AdipoQ	5' AGGAGATGCAGGTCTTCTTGGT 3'	5' TCTCCAGGCTCTCCTTTCCT 3'
AdipoR1	5' CAGCCAAGGCTXAGGAAGA 3'	5' CTTGCAGAGGAAGCGTCAG 3'
Ampk	5' AGCCGACTTTGGTCTTTCAA 3'	5' GCCTGCGTACAATCTTCCTG 3'
Ccl2	5' TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA 3'	5' GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT 3'
Cd36	5' ATGGGCTGTGATCGAACTG 3'	5' GTCTTCCCAATAAGCATGTCTCC 3'
Cpt1a	5' CTCCGCCTGAGCCATGAAG 3'	5' CACCAGTGATGATGCCATTCT 3'
F4/80	5' GAATCCTGTGAAGATGTGGATG 3'	5' GGCATGAGCAGCTGTAGGA 3'
Gapdh	5' CAAGCTCATTTCTGGTATGACA 3'	5' GCCTCTCTTGCTCAGTGTCC 3'
Hprt1	5' GGCTTACCTCACTGCTTTCC 3'	5' AATCACGACGCTGGGCACTCC 3'
Il1b	5' TGGGATCCCACTCTCCA 3'	5' GGAGAACCAAGCAACGAC 3'
Il-6	5' GTTGTGCAATGGCAATTCTG 3'	5' CCAGTTTGGTAGCATCCATC 3'
Lpl	5' GTCTGGCTGACACTGGACAAA 3'	5' CCCACTTTCAAACACCCAAA 3'
Nfkb	5' CCAACTGGCAGGTATTTGAC 3'	5' GCTGCTTCATGTCCCCTTG 3'
Scd1	5' TCCAGAATGACGTTACGATG 3'	5' CACGTGAGAGAAGAAGAAGC 3'
Stat3	5' ATGCGGAGAAGCATTGTAG 3'	5' CTTCCAGTCAGCCAGCTCTT 3'

3.10 Atividade da citrato sintase

No final do experimento, os músculos sóleo de camundongos foram coletados para determinação da atividade da citrato sintase para determinar a eficácia do protocolo de treinamento (OJAIMI et al., 1999). A atividade da citrato sintase foi avaliada em 10 mg de homogenatos do músculo sóleo usando o kit Citrate Synthase Activity Colorimetric Assay (Biovision, Mountain View, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.11 Análise Estatística

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

4. RESULTADOS

4.1 Protocolo experimental 1 – O papel da adiponectina como miocina na resposta metabólica e inflamatória do exercício agudo de moderada intensidade na musculatura esquelética

4.1.1 Exercício aeróbio agudo aumenta a concentração sérica e muscular de adiponectina

Animais WT apresentaram aumentado índice de adiposidade quando comparado aos animais AdKO, sem diferenças para potência aeróbia e índice muscular ([Tabela 3](#)).

Identificamos que a adiponectina pode se comportar como uma miocina (Figura 6). 2-horas após o exercício aeróbio a concentração sérica de adiponectina estava aumentada em 151% (Figura 6A). No músculo gastrocnêmio foi observado o mesmo padrão, no qual duas horas após o exercício agudo a concentração de adiponectina estava 189% mais elevada, sem alterações nos períodos 7 e 24 horas após o exercício (Figura 6B e D). Em relação a expressão gênica de adiponectina no músculo, foi encontrado um aumento no grupo exercitado (2 e 24 horas pós-exercício) em relação ao controle (Figura 6C).

Tabela 3. Índice de adiposidade e muscular e desempenho no teste de velocidade máxima entre os genótipos.

Variável	WT	AdKO	p-value
Índice de adiposidade (%)	1.82±0.07	1.63±0.05	0.031
Índice muscular (%)	1.11±0.10	1.07±0.20	0.365
Velocidade máxima (m.min ⁻¹)	23.70±0.33	22.70±0.44	0.088

Dados expressos em média±desvio-padrão. n = 28 camundongos por genótipo.

Figura 6. Efeito do exercício aeróbio agudo na conteúdo proteico e expressão gênica de adiponectina no soro e gastrocnêmio de animais WT e AdKO.

4.1.2 Animais AdKO apresentam um perfil metabólico alterado após o exercício aeróbio agudo

Após 24 horas do exercício agudo, os níveis de lactato estavam aumentados em camundongos AdKO em comparação com o exercício 2h (p-value = 0,005) (Figura 7A), enquanto nenhuma diferença entre os genótipos foi observada em relação aos níveis de glicose (Figura 7B). Após duas horas, o exercício aeróbio induziu uma diminuição mais acentuada na concentração de NEFA em camundongos WT quando comparados a camundongos AdKO, o qual foi restaurado 24 horas depois (Figura 7C). De forma semelhante, os níveis de triacilglicerol diminuíram duas horas após o exercício e foram restaurados após 24 horas de repouso apenas em camundongos WT (Figura 7D).

Figura 7. Diferenças entre genótipos no perfil metabólico.

A coloração *Sudan Black* e a análise de Folch não apresentaram diferenças no conteúdo de triacilglicerol do músculo gastrocnêmio entre os genótipos (Figura 8A-C).

Figura 8. Diferenças entre genótipos no acúmulo muscular de lipídeos.

A expressão proteica de AMPK total e fosforilada variou entre os genótipos (Figura 9). Em condições basais, camundongos AdKO apresentaram níveis aumentados de p-AMPK em comparação aos camundongos WT (p-value = 0,030) (Figura 9A [painel superior]). Os camundongos WT tenderam a aumentar a fosforilação de AMPK (Thr172) duas horas após o exercício e o nível dessa fosforilação retornou ao basal após 24 horas. Por outro lado, o exercício não foi capaz de modificar a fosforilação da AMPK nos camundongos AdKO após 2 horas. Além disso, a ativação de AMPK foi aumentada 24 após o exercício em camundongos AdKO em comparação com camundongos WT (p-value = 0,033) (Figura 9A-B). A expressão gênica de AMPK também diferiu entre os genótipos, no qual

camundongos AdKO apresentaram menor expressão 24 horas após o exercício (Figura 9C).

Em condições basais, os animais AdKO apresentaram aumentada fosforilação de ACC (p-ACC) em comparação aos WT (p-value = 0,002) (Figura 9D [painel superior]). Em camundongos WT, a razão p-ACC:Total estava aumentada após 2 horas de exercício (p-valor = 0,012) e retornou aos níveis basais após 24 horas (p-value <0,001) (Figura 9E). Além disso, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos após 2 horas de exercício (p-value = 0,002) (Figura 9E).

Figura 9. Camundongos AdKO apresentaram ativação de AMPK muscular alterada após exercício aeróbio agudo.

4.1.3 A expressão proteica de interleucina-6 é suprimida após exercício aeróbio na ausência de adiponectina

O efeito agudo do exercício na expressão da proteína IL-6 diferente entre os genótipos. Camundongos WT apresentaram concentração aumentada de IL-6 muscular quando 2 e 24 após o exercício agudo quando comparados ao AdKO (p-value < 0,001) (Figura 10A). 2 horas após o estímulo agudo, os camundongos WT apresentaram aumento da expressão gênica de IL-6 (p-value = 0,028) quando comparados ao AdKO. Entretanto, uma regulação negativa 24 horas após o exercício foi encontrada nos WT, quando comparados ao AdKO (p-value = 0,004). Além disso, os camundongos AdKO apresentaram uma diminuição na expressão do gene IL-6 duas horas após o exercício (p-value = 0,046) e uma regulação positiva 24 horas após o exercício (p-value = 0,018) (Figura 10B).

Figura 10. A expressão de proteica de IL-6 no músculo gastrocnêmio foi suprimida após o exercício físico agudo na ausência de adiponectina.

A partir desses achados, foi hipotetizado que animais AdKO poderiam apresentar diferença no conteúdo de glicogênio muscular, uma vez que o mesmo altera a expressão de IL-6. A análise de PAS nos revelou que, em condições basais, os camundongos AdKO apresentam um maior conteúdo de glicogênio quando comparado aos WT (p-value = 0,005) (Figura 10C-D).

4.1.4 O perfil inflamatório após exercício agudo é perturbado na ausência de adiponectina

Na Figura 11 está apresentada o perfil inflamatório do músculo gastrocnêmio após o exercício agudo.

Figura 11. O exercício agudo promove um fenótipo inflamatório diferente entre os genótipos.

A concentração muscular de IL-1 β apresentou um padrão diferente entre os genótipos, apesar de não estatisticamente significativa (Figura 11A). A concentração de TNF- α estava diminuída 2 horas após o exercício nos animais AdKO em relação aos WT (p-value = 0,014), e a concentração dessa citocina estava diminuída 24 horas após o exercício apenas nos animais WT (Figura 11B). As concentrações musculares de IL-10 apresentaram um perfil semelhante à da IL-6, sendo completamente diferente entre os genótipos. Nos animais WT, a concentração de IL-10 estava aumentada 2 e 24 horas após o exercício físico em comparação aos AdKO (p-value < 0,001 para ambos os períodos) (Figura 11C). Além disso, a concentração de IL-10 nos WT atingiu um pico 2 horas após o exercício e diminuiu após 24 horas, entretanto, as concentrações continuaram superiores aos níveis basais (Figura 11C).

Também foi analisado a expressão gênica de genes relacionados ao processo inflamatório pós-exercício. A expressão de STAT3 estava diminuída após 24 horas de exercício físico nos animais WT quando comparado ao período 2 horas (p-value = 0,026), perfil não observado na ausência de adiponectina (Figura 11D). 2 horas após o exercício físico, a expressão gênica de F4/80, marcador clássico de macrófagos, estava diminuída apenas nos animais AdKO (p-value = 0,032) (Figura 11E). Por fim, nenhuma diferença estatística foi encontrada para a expressão de ADIPOR1 (Figura 11F).

Na Figura 12 está apresentado a expressão proteica e gênica de NF- κ B. Apesar de nenhuma diferença estatística ter sido encontrada, a expressão de NF- κ B fosforilado e total apresentou um padrão diferente entre os genótipos (Figura 12A-C). A expressão gênica de NF- κ B não foi diferente entre os genótipos após a sessão de exercício (Figura 12D).

Figura 12. Animais AdKO apresentam diferente expressão proteica de NF- κ B após o exercício agudo no músculo gastrocnêmio

Na Figura 13 está apresentado o diagrama esquemático dos principais achados do presente braço da tese.

Figura 13. Diagrama esquemático dos efeitos do exercício físico na musculatura esquelética na presença ou ausência de adiponectina.

4.2 Protocolo experimental 2 - O papel do treinamento aeróbio na regulação do metabolismo e inflamação hepática em camundongos alimentados com dieta rica em lipídios.

4.2.1 A dieta hiperlipídica não aumentou a inflamação nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal

A primeira hipótese do presente desenho experimental era de que a dieta hiperlipídica (HFD) poderia estimular o processo de remodelamento do tecido adiposo, o qual apresentaria marcadores inflamatórios aumentados. Para abordar essa hipótese, primeiramente foi analisado a concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias nos tecidos adiposos subcutâneo e retroperitoneal de camundongos alimentados com dieta SD e HFD (Figura 14).

Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos nas concentrações de citocinas no tecido adiposo subcutâneo (p -value $> 0,05$) (Figura 14A-F). Entretanto, no tecido adiposo retroperitoneal os grupos alimentados com HFD apresentaram valores inferiores de IL-6, TNF- α e VEGF, quando comparados ao SD (Figura 14G-L).

Figura 14. A dieta hiperlipídica não aumentou a produção de citocinas nos tecidos adiposos.

Diante desses desfechos, investigamos a expressão de proteínas chaves no processo inflamatório do tecido adiposo subcutâneo, como o NF- κ B e o PPAR- γ (Figura 15). Não foi encontrado diferenças entre os grupos para a ativação de NF- κ B (Figura 15A-B), entretanto, apesar de não significativo, foi encontrado em valores aumentados de PPAR- γ no grupo HFD (p -value = 0,110) (Figura 15C-D).

Recentemente, nosso grupo publicou a composição de lipídeos da dieta padrão e hiperlipídica (DE SOUZA et al., 2020). Inesperadamente, a HFD, rica em gordura hidrogenada, era composta de 25,7 e 2,1 vezes mais ácido oleico e linoleico, respectivamente (p -value $< 0,001$) (Figura 15E).

Figura 15. A dieta hiperlipídica não modulou a ativação de NF- κ B no tecido adiposo subcutâneo, mas regulou positivamente a expressão proteica de PPAR- γ .

4.2.2 O treinamento aeróbio melhora a atividade da citrato sintase

Na Figura 16 é apresentado o efeito do treinamento aeróbio na aptidão aeróbia. No início do protocolo, não foi encontrada diferenças entre os grupos experimentais (p-value = 0,205 (Figura 16C). Após 8 semanas de treinamento aeróbio, o grupo exercitado (HFD+T) não apresentou diferença nos valores de MAS (p-value = 0,110) (Figura 16D). No entanto, o treinamento aeróbio melhorou a atividade da citrato sintase no músculo sóleo (p-value = 0,023) (Figura 16E).

Figura 16. Desenho experimental e efeitos do treinamento aeróbio em parâmetros fisiológicos.

4.2.3 O treinamento aeróbio atenua o aumento de peso corporal, reduz a ingestão calórica e melhora a sensibilidade à insulina

O treinamento aeróbio foi eficaz em reduzir o ganho de peso corporal e o peso final (p-value < 0,05 vs HFD) (Figura 17A-C), bem como a ingestão calórica (p-value < 0,001 vs SD e HFD) (Figura 17D). Apesar de um reduzido ganho de peso, nenhuma diferença foi encontrada no grupo HFD-T para o índice de adiposidade (p-value = 0,576 vs HFD) (Figura 17B), sendo a diferença no peso melhor explicada pelo índice de massa magra (Figura 18).

Figura 17. Treinamento aeróbio atenua o ganho de peso corporal.

Figura 18. Diferenças entre a massa magra e gorda entre os grupos experimentais.

É importante mencionar que a HFD é mais densa caloricamente do que a SD, o que significa que os animais do grupo SD ingeriram uma maior quantidade de gramas do que o grupo HFD. Portanto, o grupo HFD era mais pesado do que o SD devido às diferenças no padrão de atividade física (MORETTO et al., 2017), desfecho esse não avaliado no projeto. Além disso, a HFD aumentou a hipertrofia dos adipócitos (p-value = 0,014 vs SD), a qual foi ligeiramente atenuada pelo treinamento aeróbio (Figura 19A, C e D).

Figura 19. Treinamento aeróbio atenua a hipertrofia do adipócito, mas não o índice de adiposidade.

Na Figura 20 é apresentado os efeitos do treinamento aeróbio na concentração sérica de metabólitos e na Figura 21 os parâmetros relacionados com tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. HFD aumentou as concentrações de glicose (p-value = 0,028) e o treinamento aeróbio não foi capaz de atenuar esse parâmetro (Figura 20A). Nenhuma

diferença foi encontrada para a concentração de colesterol total, independentemente da intervenção (Figura 20B). O treinamento aeróbio diminuiu as concentrações de triacilglicerol e NEFA quando comparado ao grupo SD (p-value < 0,05) (Figura 20C-D).

Figura 20. Treinamento aeróbio melhora o perfil lipídico.

O grupo HFD apresentou severa intolerância à glicose (p-value < 0,001 vs SD) e o treinamento aeróbio não foi capaz de recuperar esse parâmetro (Figura 21A-B). A concentração de insulina aos 30' estava aumentada no grupo HFD (p-value = 0,002 vs SD); no entanto, o treinamento aeróbio melhorou esse desfecho (p-value = 0,006 vs HFD) (Figura 21C). A razão glicose-insulina e fosforilação do IRS-1 no resíduo de serina 302 não foi diferente entre os grupos experimentais, apesar de uma tendência no grupo exercitado apresentar valores superiores de p-IRS-1 (Ser302) (p=0,054) (Figura 21D-F).

Figura 21. Treinamento aeróbio atenua a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica.

4.2.4 O treinamento aeróbio atenua a progressão da esteatose macrovesicular e inflamação através da via AMPK-PPAR- α e ativação de PPAR- γ

Nas Figura 22 e Figura 23 são apresentados os resultados acerca do acúmulo de lipídeos hepáticos e a progressão da NAFLD. Apenas o peso absoluto do fígado apresentou diferenças entre os grupos, sendo superior nos animais que consumiram HFD (p-value = 0,024) (Figura 22A), enquanto que peso relativo e concentração de colesterol hepático não foram modulados pelas intervenções (Figura 22C-D).

Figura 22. A dieta hiperlipídica aumenta o peso do fígado.

Na Figura 23 está apresentado os efeitos do treinamento aeróbio nos marcadores de NAFLD. A HFD aumentou todos os marcadores de NAFLD (p-value < 0,05 vs SD), exceto a hipertrofia dos hepatócitos (p-value = 0,364 vs SD), e o treinamento aeróbio foi capaz de atenuar a esteatose macrovesicular e agregado inflamatório celular (p-value > 0,05 vs SD) (Figura 23A-E). Não obstante, nenhuma diferença entre os grupos experimentais foi encontrada para o escore de NAFLD (Figura 23F).

Figura 23. Treinamento aeróbio atenua a progressão da esteatose macrovesicular e inflamação hepática.

Apesar de exacerbada esteatose e nível inflamatório estarem presente no grupo HFD, não foi observado um acúmulo significativo de fibrose (p-value > 0,05) (Figura 24A-C). Entretanto, as concentrações de TGF- β foram inferiores no grupo exercitado (p-value > 0,03).

Figura 24. A dieta hiperlipídica não aumentou a quantidade de colágeno no fígado.

Posteriormente, foi avaliado a expressão proteica de PPAR- γ e a expressão gênica de seus genes alvos. Não foi encontrado efeito das intervenções na expressão proteica de PPAR- γ (Figura 25A-B). Por outro lado, o treinamento aeróbio regulou positivamente a expressão gênica de genes alvos do PPAR- γ , como o *Cd36* (p-value < 0,05 vs SD e HFD) e o *Scd1* (p-value = 0,001 vs SD) (Figura 25C-D). Nenhuma diferença estatística foi encontrada para a expressão gênica de *Lpl* (Figura 25E).

Outra via de sinalização hepática de nosso interesse era a da AMPK-PPAR- α . O treinamento aeróbio aumentou a fosforilação do resíduo de treonina 172 da AMPK α (p-value < 0,05 vs SD e HFD) (Figura 25A e F), bem como a expressão proteica de PPAR- α (p-value = 0,016 vs SD) (Figura 25A e G). Também foi observado uma tendência para expressão aumentada de PPAR- α no grupo HFD+T em relação ao HFD (p-value = 0,062) (Figura 25A e G). De fato, a expressão dos genes *Acox* e *Cpt1a*, alvos do PPAR- α , estavam aumentados no grupo HFD+T (p-value < 0,05 vs SD) (Figura 25H-I).

Figura 25. O treinamento aeróbico ativa a sinalização AMPK-PPAR- α e PPAR- γ hepática.

Posteriormente, foi analisado o efeito das intervenções na expressão proteica dos cinco complexos mitocondriais (Figura 26). Não foi encontrado diferenças entre os grupos experimentais para os complexos V, IV e I (p-value > 0,05) (Figura 26A-B). Para o complexo III, o grupo HFD apresentou expressão proteica diminuída em relação ao SD (p-value = 0,004) e o grupo HFD+T expressão diminuída em relação aos demais grupos (p-value < 0,05 vs SD e HFD) (Figura 26A-B). Para a expressão do complexo II, o grupo HFD+T apresentou valores aumentados em relação ao HFD (p-value = 0,041) (Figura 26A-B).

Figura 26. Efeito da dieta hiperlipídica e treinamento aeróbio na expressão proteica dos complexos mitocondriais.

Em relação à inflamação hepática, nós encontramos que a deita hiperlipídica não aumentou a concentração de nenhuma citocina analisada, enquanto que o treinamento

aeróbio foi eficaz em reduzir a concentração de todas as citocinas analisadas, como o TNF- α , IL-10, MCP-1 e IL-6 ($p < 0,005$ vs SD e HFD) (Figura 27A-D), apesar da aumentada fosforilação de NF- κ B no resíduo de serina 536 (Figura 27E-F). De fato, quando avaliado a expressão gênica de genes alvo do NF- κ B, como Il1b e Ccl2, nenhuma diferença entre os grupos experimentais foi encontrada (p -value $> 0,05$) (Figura 27G-H).

Figura 27. O treinamento aeróbico alivia a inflamação do fígado, independentemente da expressão de NF- κ B.

Figura 28. O treinamento aeróbico atenua os marcadores da NAFLD por meio da sinalização AMPK-PPAR- α e da ativação do PPAR- γ .

5. DISCUSSÃO

A presente tese foi dividida em dois desenhos experimentais diferentes. O primeiro tinha como objetivo analisar o papel da adiponectina nos efeitos agudos do exercício físico na musculatura esquelética. Nós encontramos que, aparentemente, a adiponectina é liberada pela musculatura esquelética durante e após o exercício físico, a caracterizando como uma miocina. Os principais efeitos observados na presença dessa miocina, não observados em animais AdKO, foram a clara ativação da AMPK e liberação de IL-6 pós-exercício agudo e a modulação no processo inflamatório. O segundo desenho experimental tinha como principal objetivo analisar o efeito do treinamento aeróbio em marcadores de NAFLD, metabolismo e inflamação hepática. Nós encontramos que o treinamento aeróbio ativou a via da AMPK-PPAR α e PPAR- γ , resultando em um melhor perfil inflamatório e ligeira diminuição do acúmulo de lipídeos.

5.1 Protocolo experimental 1 – O papel da adiponectina como miocina na resposta metabólica e inflamatória do exercício agudo de moderada intensidade na musculatura esquelética

No presente desenho experimental, foi demonstrado que a adiponectina estava aumentada no soro e músculo após o exercício agudo de moderada intensidade, caracterizando-a como uma miocina. Além disso, camundongos AdKO apresentaram fenótipos metabólicos e inflamatórios alterados após exercício aeróbio agudo.

Vários estudos têm demonstrado que após o exercício agudo, principalmente os de característica exaustiva, as concentrações de adiponectina sérica aumentam acima dos níveis basais (KRAEMER et al., 2003; JURIMAE et al., 2005; SIMPSON & SINGH, 2008). De maneira semelhante, nós encontramos que duas horas após o exercício agudo as

concentrações de adiponectina aumentaram não apenas no soro, mas também na musculatura esquelética. Para confirmar se a adiponectina estava sendo produzida pelo músculo esquelético, nós realizamos a análise da expressão gênica, no qual houve um aumento da adiponectina 2 e 24 horas após o exercício agudo. Portanto, essa é a primeira evidência mostrando que o exercício físico pode estimular a produção de adiponectina pela musculatura esquelética.

O pioneiro na descoberta da adiponectina como uma miocina foi o Professor Matthew Krause, que em 2008 identificou em ensaios *in vivo* e *in vitro* que a adiponectina era produzida por células musculares, principalmente em fibras com maior concentração de lipídeos intramusculares (KRAUSE et al., 2008). Posteriormente, outros estudos também identificaram que ela poderia ser liberada pela musculatura esquelética, especialmente quando tratadas com agonista de PPAR- γ (LIU et al., 2009; AMIN et al., 2010), tendo como principal efeito a melhora na captação de glicose e sensibilidade à insulina nesse tecido. Apesar dos avanços na área, ainda não está claro como o exercício agudo promove o aumento de adiponectina sistêmica, mas, possivelmente, esse é um efeito parcialmente dependente de alterações hormonais, como catecolaminas e insulina (JURIMAE et al., 2005; IMBEAULT et al., 2009; NUMAO et al., 2011).

Apesar de bem conhecidos os efeitos da adiponectina na metabolismo da glicose (LIU et al., 2009), sua falta (animais AdKO) apresentou pouco efeito nas alterações de lactato e glicose 2 horas após a sessão aguda de exercício físico. Entretanto, nós encontramos um aumento na concentração de lactato em animais AdKO 24 horas após o exercício físico, sugerindo que este genótipo aumentou a utilização da via glicolítica durante o período de recuperação.

As relação às alterações nas concentrações plasmáticas de NEFA, nós encontramos uma redução da sua concentração apenas em animais WT, padrão não observado em animais AdKO. Sabe-se que durante o exercício aeróbio de intensidade moderada (~65% VO₂max) a utilização do metabolismo oxidativo para produção de energia é predominante, levando à mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo e posterior absorção e oxidação na musculatura esquelética. Portanto, como os camundongos AdKO apresentaram menores concentrações de NEFA circulantes, esperávamos que o acúmulo de lipídeos intramuscular estivesse aumentada, como já descrito por Krause et al. (2008), entretanto, essa hipótese não foi confirmada pela análise histológica e de conteúdo lipídico muscular. Tomados em conjunto, acreditamos que o

genótipo AdKO não é eficiente na utilização de ácidos graxos como substrato energético muscular, muito provavelmente devido a melhor eficiência na utilização de glicose para a manutenção da homeostase energética muscular.

Cabe-se ressaltar também que uma vez que a adiponectina exerce efeitos antilipolíticos em adipócitos, era esperado um aumento de metabólitos da lipólise (e.g. NEFA) em animais AdKO, no entanto, esse desfecho não foi observado (MA et al., 2002). Duas hipóteses foram postuladas para explicar esses resultados, a primeira é a diminuição na expressão de IL-6, conhecido agente lipolítico (PEDERSEN et al., 2003), nos animais AdKO e a segunda o aumento do acúmulo de glicogênio muscular, o que poderia poupar a utilização de ácidos graxos pela musculatura esquelética.

Um outro regulador chave do metabolismo lipídico que pode estar envolvido nas diferenças do comportamento do NEFA encontradas entre os genótipos é a AMPK. AMPK é um complexo heterotrimérico constituído por uma subunidade α catalítica e subunidades β e γ reguladoras, descrito na literatura como um sensor energético celular, ativado pela queda no estado energético celular, sinalizado pelo aumento da razão AMP/ATP (O'NEILL et al., 2013; LIN & HARDIE, 2017). No presente desenho experimental, nós encontramos que os camundongos AdKO apresentaram níveis aumentados de fosforilação de AMPK^{Thr172} nas condições basais quando comparado aos WT. A Ativação farmacológica e pelo exercício físico aumentam a absorção e oxidação de lipídeos (WINDER et al., 2000; IWABU et al., 2010; RITCHIE et al., 2014), fato que poderia explicar menores níveis de NEFA circulante, sem um acúmulo excessivo de lipídeos intramusculares em animais AdKO (WU et al., 2017). De fato, camundongos AdKO apresentam, paradoxalmente, um aumento na atividade enzimática da β -oxidação. Por outro lado, Ritchie et al. (2014) encontraram resultados divergentes, nos quais camundongos AdKO e WT apresentam ativação de AMPK semelhante imediatamente após o exercício físico. Usamos camundongos controles sem exercício para cada tempo e genótipo, garantindo uma melhor análise dos efeitos do exercício sobre o metabolismo e a inflamação, uma vez que o ritmo circadiano influencia esses parâmetros (GAMBLE et al., 2014).

Em resposta à contração muscular produzida pelo exercício físico, a AMPK é rapidamente fosforilada nesse tecido (WINDER & HARDIE, 1996; TOMAS et al., 2002). Nesse estudo, encontramos que a ativação de AMPK pelo exercício físico foi perturbado em animais AdKO. Esses camundongos apresentaram um padrão diferente de

fosforilação da AMPK após o exercício físico, caracterizado pela diminuição da fosforilação de AMPK (Thr172) após o exercício, apesar de níveis mais elevados quando comparado ao WT, principalmente após 24 horas. Dessa forma, nós acreditamos que o background genético dos animais AdKO poderia estar regulando positivamente a ativação de AMPK através de mecanismos adjacentes não investigados nesse estudo, uma vez que não há adiponectina sendo produzida nesses animais e ela é um conhecida por ser um ativador de AMPK no músculo (TOMAS et al., 2002; IWABU et al., 2010).

Outra função bem descrita da ativação da AMPK é a inibição da atividade de ACC, por meio de sua fosforilação no sítio Ser79 (MUNDAY et al., 1988; MERRILL et al., 1997; CHO et al., 2015), culminando na regulação positiva da oxidação de lipídeos (O'NEILL et al., 2013). No presente estudos, nós encontramos que a fosforilação de ACC (ACC[Ser79]:total) estava aumentada duas horas após o exercício apenas em camundongos WT, mas em ambos os genótipos os valores voltaram ao basal após 24 horas. Portanto, os camundongos AdKO parecem ter menos sensibilidade à inativação de ACC induzida por AMPK. Estudos têm mostrado resultados semelhantes, pelos quais a ativação da AMPK por meio de medicamentos ou induzidos por exercício físico, de fato, suprime a atividade de ACC, reduzindo, portanto, os níveis de malonil-CoA, aliviando a inibição de CPT-I, o que permite que o ácido graxo seja oxidado (WINDER et al., 1990; WINDER, 1998; HERZIG & SHAW, 2018).

Outro efeito bem característico do exercício físico é o aumento transitório dos níveis de IL-6 no músculo e circulação sanguínea (PEDERSEN & FEBBRAIO, 2008). Nesse estudo, nós verificamos que o aumento nas concentrações musculares de IL-6 foram completamente mitigados após o exercício físico na ausência de adiponectina, enquanto que foram reguladas positivamente 2 e 24 horas após o exercício físico em animais WT. A diferença na resposta de IL-6 entre os genótipos pode estar relacionada às concentrações de glicogênio em condições basais, uma vez que existe uma relação entre os estoques de glicogênio muscular e a resposta de IL-6 pelo exercício (KELLER et al., 2001). A baixa concentração de glicogênio muscular estimula a produção de IL-6 durante o exercício físico, favorecendo o padrão observado em camundongos WT.

Pedersen, Febbraio (2008) mostraram que a contração muscular induzida pelo exercício físico estimula a liberação de IL-6 pelas fibras musculares, a qual pode influenciar na depleção de glicogênio hepático, promovendo aumento dos níveis de glicose no sangue, bem como, aumentar a captação de glicose muscular e oxidação de

gorduras, por meio, respectivamente, da sinalização Akt e STAT3-AMPK (KELLER et al., 2001; PEDERSEN & FEBBRAIO, 2012). Não encontramos modulação na expressão do gene STAT3 2 horas após o exercício agudo.

Outra via que pode estar relacionada à via de sinalização AMPK-IL-6 é a do Ca^{2+} . Quando linhagens celulares de miotubos foram tratadas com IL-6, foi observado um aumento da sinalização dependente de Ca^{2+} , e subsequente ativação da CaMKK β , a qual é responsável pela fosforilação da subunidade α da AMPK em resíduos de Thr172. Knudsen et al. (2017) mostraram que a ausência de IL-6 no músculo esquelético diminui a fosforilação da AMPK. De fato, nós encontramos que em camundongos WT a cinética da proteína IL-6 e da fosforilação de AMPK é muito semelhante, padrão que foi completamente perturbado nos animais AdKO.

Também observamos em camundongos WT que após 24 horas de exercício os níveis de IL-6 ainda estavam elevados. Keller et al. (2001) mostraram que o pico da expressão do gene IL-6 ocorre 3 horas após o exercício físico, o qual será traduzido em proteína horas após, podendo explicar esse aumentado nível tardio nos animais WT. Além disso, cabe-se ressaltar também que existe um feedback positivo da produção de IL-6 e sua expressão gênica, uma vez que células musculares *in vitro* tratadas com IL-6 apresentaram um aumento da expressão sua expressão gênica (WEIGERT et al., 2007).

Nós hipotetizamos que a sinalização de Ca^{2+} pode estar envolvido na diminuída expressão de IL-6 em animais AdKO. Sabe-se que a produção de IL-6 durante o exercício físico pode ser regulada pelas elevações de Ca^{2+} citosólicos, o qual pode ativar proteínas quinases que regulam a ativação do fator de transcrição NFAT, principal regulador da expressão gênica de IL-6 (PEDERSEN & FEBBRAIO, 2008). Iwabu et al. (2010) destaca a importância da sinalização da adiponectina-AdipoR1 no aumento das concentrações de Ca^{2+} citosólico. Portanto, o aumento de IL-6 na musculatura esquelética induzido pelo exercício físico pode ser prejudicado pela diminuição das concentrações de Ca^{2+} citosólico em camundongos AdKO. Além disso, o fator de aumento de miócitos-2 (MEF-2) parece regular a expressão de IL-6 no músculo (ALLEN et al., 2014), o qual é prejudicado na ausência de adiponectina (DADSON et al., 2015), um mecanismo plausível para a baixa resposta da IL-6 frente ao exercício físico em animais AdKO.

Apesar das baixas concentrações proteicas de IL-6, a expressão gênica de IL-6, principalmente 24 após a sessão de exercício físico, estava positivamente regulada em camundongos AdKO, sugerindo que as modificações pós-traducionais podem estar afetando a expressão proteica dessa citocina. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Em relação ao perfil inflamatório muscular, nós encontramos que os animais AdKO apresentaram diferentes produções de TNF- α , IL-10 e IL-6 e expressão do gene F4/80, um bem estabelecido marcador de macrófagos. Este tipo de célula imune desempenha duas funções distintas na plasticidade muscular induzida pelo exercício, a fase inicial do reparo muscular e, posteriormente, a fase de resolução (RIGAMONTI et al., 2014). Nos estágios iniciais do reparo muscular, macrófagos polarizados M1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , que estimulam a limpeza do tecido lesado (KAWANISHI et al., 2016; KOELWYN et al., 2017). Em nosso estudo, os animais WT apresentaram um ligeiro aumento de TNF- α 2 horas após o exercício físico e sua concentração diminuiu após 24 horas, enquanto que nos animais AdKO nós observamos uma diminuição dessa citocina 2 horas após o exercício, desfecho que corresponde à menor expressão de F4/80 no mesmo período. Não encontramos diferenças entre os genótipos para IL-1 β . Também não encontramos diferença nas alterações induzidas pelo exercício no NF- κ B, sugerindo que a produção de mediadores inflamatórios foi independente dessa sinalização.

Posteriormente, durante a fase de resolução, macrófagos polarizados para o fenótipo M2 secretam citocinas imunomoduladoras, IL-10 e TGF- β , os quais estimulam a reparação e regeneração tecidual (KOELWYN et al., 2017). Aqui, nós mostramos que em animais AdKO a produção de IL-10 foi totalmente suprimida após o exercício físico, enquanto que aumentada no genótipo WT. Estudos clássicos e recentes mostraram um aumento na IL-10 pós-exercício (OSTROWSKI et al., 1999; CABRAL-SANTOS et al., 2015), que parece regular a regeneração muscular (TIDBALL & VILLALTA, 2010; DENG et al., 2012; KOELWYN et al., 2017). Curiosamente, a adiponectina desempenha um papel na regeneração muscular através da estimulação das células satélites (FIASCHI et al., 2010; FIASCHI et al., 2012; FIASCHI et al., 2014). Além disso, a IL-10 parece ser majoritariamente secretada por macrófagos infiltrados no músculo (FURRER et al., 2017), sugerindo novamente que há menos recrutamento de macrófagos no músculo esquelético de camundongos AdKO após exercício agudo. Portanto, nossos resultados sugerem que a

falta de adiponectina pode prejudicar a regeneração muscular após exercício agudo devido a diminuição da produção de citocinas pelos macrófagos.

Portanto, concluímos que a adiponectina influencia o metabolismo muscular, principalmente pela mudança de substrato energético muscular e diminuição na fosforilação de AMPK induzida por exercício, bem como, influencia o perfil inflamatório e produção muscular de IL-6 após um exercício aeróbio agudo.

5.2 Protocolo experimental 2 – O papel do treinamento aeróbio na regulação do metabolismo e inflamação hepática em camundongos alimentados com dieta rica em lipídeos.

Neste estudo, mostramos que 8 semanas de treinamento aeróbio podem melhorar a resistência à insulina por meio de uma ligeira atenuação da progressão da esteatose macrovesicular do fígado e diminuição da inflamação do fígado em camundongos obesos. Nossa hipótese é que esses desfechos estão relacionados com a ativação da sinalização AMPK-PPAR- α e a regulação positiva do PPAR- γ no fígado. Portanto, nossos resultados fornecem uma evidência adicional de que o treinamento físico pode ser uma intervenção terapêutica não farmacológica viável, pelo menos para atrasar a progressão da NAFLD induzida por dieta rica em gordura.

Inicialmente, a hipótese desse desenho experimental era de que a dieta hiperlipídica poderia influenciar o desenvolvimento de um perfil pró-inflamatório no tecido adiposo, como já demonstrado por diversos estudos ([HOTAMISLIGIL, 2017](#)). Entretanto, nós encontramos que a HFD, apesar de causar acúmulo de gordura nos animais, não alterou negativamente o perfil de citocinas inflamatórias nos depósitos de tecido adiposo analisados. Esses resultados nos levaram a investigar a expressão de PPAR- γ no tecido adiposo subcutâneo, uma vez que é a principal isoforma presente nesse tecido e que tem como função principal a regulação metabólica e inflamatória ([AHMADIAN et al., 2013](#)). De fato, esse desfecho foi confirmado, no qual encontramos uma aumentada expressão de PPAR- γ nos animais alimentados com HFD, desfecho que pode ser explicado pela alta concentração de ácido graxo oleico (C18:1n-9) e linoleico (C18:2n-6) presentes na dieta.

A ferramenta utilizada nesse estudo para melhorar e/ou atenuar a progressão da esteatose hepática foi o treinamento aeróbio. O treinamento aeróbico é uma ferramenta terapêutica bem estabelecida contra diversas doenças crônicas não transmissíveis, como dislipidemia, hipertensão e diabetes, e recentemente tem sido sugerido como uma

intervenção terapêutica eficiente para atenuação da progressão da esteatose hepática, tanto humanos quanto em modelos animais ([KAWANISHI et al., 2012](#); [BACCHI et al., 2013](#); [MA et al., 2014](#); [PAREJA-GALEANO et al., 2015](#)). Aqui, nós mostramos que o treinamento aeróbico pode atrasar alguns aspectos da NAFLD, mas não atenuar todas as perturbações metabólicas. De fato, as diretrizes atuais para NAFLD recomendam de maneira enfática dieta de restrição calórica associada à exercícios físicos visando a diminuição de peso para o tratamento desta doença ([ROMERO-GÓMEZ et al., 2017](#)). Como no presente desenho experimental os animais foram alimentados com HFD durante todo o protocolo de treinamento, nós entendemos que esse é um dos motivos pelos quais não foi observado uma melhora expressiva de parâmetros da NAFLD em animais treinados. Além disso, recentemente [Fuente et al. \(2019\)](#) encontraram resultados semelhantes, nos quais 8 semanas de exercícios aeróbicos não foram capazes de diminuir os lipídios intra-hepáticos, mas resultou em uma melhora da resistência à insulina e uma diminuição do tamanho gotícula de lipídeo hepática.

Outro parâmetro relevante analisado nesse desenho experimental foi a resposta da insulina e glicose frente à dieta e treinamento físico. Nós encontramos severa intolerância à glicose nos grupos que receberam dieta hiperlipídica, independente do treinamento físico. Entretanto, os níveis de insulina estavam diminuídos nos animais que exercitados aos 30 minutos do teste de GTT, indicando uma possível melhora na sensibilidade à insulina nesse grupo. Além disso, o grupo HFD+T apresentou uma tendência em maior ativação de IRS-1 em Ser302. Ainda não está claro o papel da fosforilação de IRS-1 em serina 302 na cascata de sinalização da insulina ([GIRAUD et al., 2004](#); [COPPS et al., 2016](#)). [Giraud et al. \(2004\)](#) demonstraram que em vários tipos celulares a insulina e IGF-1 estimularam a fosforilação em Ser302, de maneira depende de mTORC2. De fato, IRS-1 apresenta a sequência consenso da mTORC no resíduo de Ser302 e a inibição farmacológica da mTORC atenua a fosforilação desse resíduo, indicando que a mTORC é a quinase *upstream* responsável pela fosforilação desse resíduo ([GIRAUD et al., 2004](#); [HSU et al., 2011](#)).

Estudos têm demonstrado que o acúmulo de lipídios no fígado pode ser atribuído à regulação negativa da oxidação de ácidos graxos e secreção de VLDL, ou seja, regulação positiva das vias adipogênicas e lipogênicas, bem como, ao aumento da entrega de ácidos graxos ao fígado ([FOULDS et al., 2017](#)). No presente, nós encontramos uma ligeira atenuação da esteatose hepática macrovesicular e um aumento na ativação de

AMPK e PPAR- α no grupo exercitado. Apesar de ainda não bem descrito, o PPAR- α contém a sequência consenso alvo da AMPK localizada ao entorno do resíduo de Ser452 (BRONNER et al., 2004; MENG et al., 2011), o que nos levar a acreditar que a AMPK ative diretamente, através de fosforilação, o PPAR- α .

Como já descrito no desenho experimental anterior, a AMPK é uma proteína heterotrimérica (subunidades α , β e γ), que funciona como um sensor energético celular, sendo capaz de reconhecer, através da subunidade γ , baixos níveis celulares de ATP, desfecho que desencadeia uma série de reações, incluindo sua fosforilação em Thr172 na subunidade α por proteínas-quinases *upstream*. Essa série de eventos levam ao aumento da captação de glicose e oxidação de lipídios (HERZIG & SHAW, 2018). É descrito na literatura, especialmente no músculo esquelético (WINDER & HARDIE, 1996; WOJTASZEWSKI et al., 2000), que o treinamento aeróbio ativa a AMPK. No fígado, a ativação da AMPK está relacionada com a melhora do metabolismo e inflamação (DE SOUZA et al., 2017; HERZIG & SHAW, 2018). Interessantemente, a falta de AMPK não parece ser um fator predominante no desenvolvimento e progressão da esteatose hepática, mas a sua ativação é essencial para normalizar o acúmulo de lipídios (BOUDABA et al., 2018), muito provavelmente pela inibição da mTORC1 (LI et al., 2014). Dessa forma, ativação da AMPK que encontramos no grupo exercitado pode estar relacionada com a melhora de parâmetros hepáticos e resistência à insulina.

A expressão da proteína PPAR- α e a sua atividade transcricional também foram reguladas positivamente no grupo exercitado. PPAR- α é o principal regulador do metabolismo oxidativo hepático (PAWLAK et al., 2015) e sua ativação está relacionada à melhora da esteatose hepática, inflamação e fibrose em modelos de roedores (STAELS et al., 2013). Em experimentos prévios, nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a melhora de alguns parâmetros hepáticos pode ocorrer independentemente da ativação do PPAR- α (BATATINHA et al., 2017), portanto, nós acreditamos que a AMPK pode ser o principal elo entre o treinamento físico e a melhora da esteatose hepática.

Como reguladores do metabolismo oxidativo estavam regulados positivamente no grupo exercitado, resolvemos investigar a expressão proteica dos complexos mitocondriais. Encontramos que a HFD desregulou a expressão dos complexos II e III e o treinamento foi eficaz em normalizar a expressão apenas do complexo II. (FLETCHER et al., 2014) encontraram que o treinamento de corrida voluntário, mas não o na esteira ergométrica, aumentou a atividade de fluxo de elétrons do complexo I e II em ratos.

Além disso, os autores não encontraram diferenças na expressão proteica dos complexos mitocondriais em animais treinados na esteira (FLETCHER et al., 2014). Entretanto, outros índices de atividade mitocondrial foram regulados positivamente no estudo supracitado, o que pode indicar que apesar de nenhuma modulação pelo treinamento aeróbio em esteira na quantidade proteica dos complexos ter sido encontrada, as funções mitocondriais estavam reguladas positivamente. Resultados similares foram encontrados por Sun et al. (2010), no qual 8 semanas de treinamento aeróbio foi eficaz em aumentar a atividade dos complexos I, IV e V. Cabe-se ressaltar que na presente tese a análise de expressão proteica foi realizado em um lisado hepático com, provavelmente, diversos tipos celulares além de hepatócitos, o que pode confundir os achados.

Outro modulador do metabolismo lipídico modulado no grupo exercitado foi o PPAR- γ , no qual um aumento na expressão de genes alvo do PPAR- γ , *Scd1* e *Cd36*, foi observada, sugerindo uma regulação positiva da sua atividade transcricional em camundongos do grupo HFD+T. Embora o exercício agudo regule negativamente a atividade do PPAR- γ (SHEN et al., 2016), os protocolos de exercícios de médio e longo prazo foram associados a uma regulação positiva da atividade de ligação ao DNA do PPAR- γ e da sua expressão proteica (PETRIDOU et al., 2003; THOMAS et al., 2012; LIU et al., 2015; ZHENG & CAI, 2019), corroborando nossos achados. O PPAR- γ é responsável pela regulação do processo de adipogênese, aumentando a expressão gênica de proteínas chaves que suportam a expansão de gotículas de lipídeos, como FAT/CD36, esteroil-CoA dessaturase-1, perilipinas, entre outras (LOWE et al., 2011). Estudos têm demonstrado que o KO de PPAR- γ em hepatócitos apresenta um efeito protetor contra o desenvolvimento de esteatose induzida por dieta hiperlipídica (MORÁN-SALVADOR et al., 2013; MORA-RODRIGUEZ et al., 2014). Portanto, formulamos a hipótese de que a regulação positiva do PPAR- γ encontrada em camundongos exercitados reduz a capacidade do treinamento aeróbio de atenuar a esteatose hepática. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa suposição.

Apesar de favorecer a adipogênese e, dessa forma, o acúmulo de lipídios hepáticos, a ativação de PPAR- γ está relacionada com a repressão da atividade transcricional do NF- κ B através de diferentes vias, como a ligação direta ao NF- κ B evitando a sua ligação no elemento responsivo, o sequestro de coativador compartilhado (e.g. NCoA), o estímulo da expressão de proteínas repressoras (e.g. I κ B α), entre outros efeitos repressores (LUCONI et al., 2010). Corroborando os nossos achados, Bastien et al.

(2019) encontraram que em humanos um ano de tratamento com rosiglitazona, um clássico ativador de PPAR- γ , melhorou a inflamação e a resistência à insulina, enquanto que piorou os parâmetros de composição corporal. Assim, a regulação positiva do PPAR- γ pode ser capaz de mitigar a inflamação, mas também regula positivamente a maquinaria celular de expansão de gotículas lipídicas.

Apesar de menos estudado, o PPAR- γ também parece induzir a expressão de proteínas mitocondriais chave (por exemplo, CPT-1 e UCP-1) (FANALE et al., 2017), sugerindo um papel no metabolismo e saúde mitocondrial. Portanto, o exercício físico pode promover um ajuste fino na regulação do armazenamento e oxidação de lipídios, geralmente prejudicado pela dieta rica em lipídios.

Ainda sobre a diminuição da inflamação encontrada no grupo exercitado, existe um conjunto de evidências que sugerem que a AMPK também desempenha um papel imunomodulatório (CORTON et al., 1995; SAG et al., 2008; GALIC et al., 2011; CARLING et al., 2012; HE et al., 2015). Galic et al. (2011) mostraram que a ablação da subunidade $\beta 1$ de AMPK em células hematopoiéticas levou ao fenótipo de macrófagos clássicos M1, caracterizado pelo aumento da expressão de IL-6 e TNF- α e aumento da razão sintase de óxido nítrico e arginase-1, um índice comum do fenótipo M1 clássico. A ativação farmacológica de AMPK também bloqueia a expressão de citocinas pro-inflamatórias após estímulo por lipopolissacarídeos, através da inibição da via de ativação clássica M1 e degradação de I κ B- α em macrófagos (AYASOLLA et al., 2005; SAG et al., 2008). Recentemente, He et al. (2015) mostraram que em células musculares lisas, a deleção de AMPK resultou na ativação da STAT1, uma proteína inflamatória intracelular (WUNDERLICH et al., 2013), aumentando mediadores pró-inflamatórios, como interferon- γ e angiotensina-II. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o perfil anti-inflamatório hepático induzido pelo treinamento aeróbico pode ser regulado pela via da AMPK.

Vale ressaltar que prescrevemos a intensidade do exercício com base no limiar anaeróbico (FERREIRA et al., 2007), que em termos de intensidade, situa-se entre moderada a vigorosa. Recentemente, Cho et al. (2015) encontraram que o treinamento físico de intensidade moderada não foi capaz de atenuar a progressão da esteatose hepática tanto quanto o treinamento de intensidade vigorosa. Estudos têm sugerido que para ativar a AMPK no músculo esquelético durante o exercício, são necessárias intensidades acima de 60% do consumo máximo de oxigênio (FRIEDRICHSEN et al., 2013). Apesar de incerto,

parece que para melhorar de forma significativa a esteatose hepática pode ser necessária uma intensidade de exercício superior à empregada no presente estudo. Além disso, outros tecidos influenciados pelo treinamento aeróbio não analisados na presente tese, como a musculatura esquelética e tecidos adiposos, podem ter influenciados no desfecho observado.

Portanto, para esse desenho experimental concluímos que: i) o treinamento físico melhora a resistência à insulina, sem alterações na massa gorda; ii) o treinamento físico regula positivamente a via AMPK-PPAR- α e, portanto, atenua a esteatose macrovesicular e a inflamação do fígado, iii) o treinamento físico regula positivamente a atividade do PPAR- γ , diminuindo a inflamação hepática e facilitando o armazenamento de lipídios no fígado (Figura 28).

6. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, pode-se concluir que: i) a adiponectina influencia o metabolismo muscular, principalmente através da diminuição da fosforilação da AMPK induzida pelo exercício, de citocinas pró-inflamatórias e da produção de IL-6 no músculo esquelético e, ii) o treinamento aeróbio atenua a progressão da esteatose macrovesicular e inflamação hepática através da ativação da via de sinalização AMPK-PPAR- α e ativação de PPAR- γ , melhorando a resistência à insulina e intolerância à glicose em camundongos obesos.

7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, M. J.; CONSTANTINESCU, S.; TURCOTTE, L. P. AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ is an essential signal in the regulation of insulin-stimulated fatty acid uptake in control-fed and high-fat-fed mice. **Experimental physiology**, v. 97, n. 5, p. 603-617, 2012.

AHMADIAN, M.; SUH, J. M.; HAH, N. et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature medicine**, v. 19, n. 5, p. 557, 2013.

ALLEN, E.; GRAY, P.; KOLLIAS-PEARSON, A. et al. The effect of short-duration sprint interval exercise on plasma postprandial triacylglycerol levels in young men. **Journal of sports sciences**, v. 32, n. 10, p. 911-916, 2014.

AMIN, R. H.; MATHEWS, S. T.; CAMP, H. S. et al. Selective activation of PPAR γ in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 1, p. E28-E37, 2010.

ANDREELLI, F.; FORETZ, M.; KNAUF, C. et al. Liver adenosine monophosphate-activated kinase- $\alpha 2$ catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. **Endocrinology**, v. 147, n. 5, p. 2432-2441, 2006.

ASGHARPOUR, A.; CAZANAVE, S. C.; PACANA, T. et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. **Journal of hepatology**, v. 65, n. 3, p. 579-588, 2016.

AYASOLLA, K. R.; GIRI, S.; SINGH, A. K. et al. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside (AICAR) attenuates the expression of LPS-and A β peptide-induced inflammatory mediators in astroglia. **Journal of neuroinflammation**, v. 2, n. 1, p. 21, 2005.

BACCHI, E.; NEGRI, C.; TARGHER, G. et al. Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 Randomized Trial). **Hepatology**, v. 58, n. 4, p. 1287-1295, 2013.

BAKER, J. S.; MCCORMICK, M. C.; ROBERGS, R. A. Interaction among skeletal muscle metabolic energy systems during intense exercise. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2010, 2010.

BARNES, B. R.; MARKLUND, S.; STEILER, T. L. et al. The 5'-AMP-activated protein kinase $\gamma 3$ isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38441-38447, 2004.

BASTIEN, M.; POIRIER, P.; BRASSARD, P. et al. Effect of PPAR γ agonist on aerobic exercise capacity in relation to body fat distribution in men with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: a 1-yr randomized study. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 317, n. 1, p. E65-E73, 2019.

BASTIEN, M.; POIRIER, P.; LEMIEUX, I. et al. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 56, n. 4, p. 369-81, 2014.

BATATINHA, H. A.; LIMA, E. A.; TEIXEIRA, A. A. et al. Association Between Aerobic Exercise and Rosiglitazone Avoided the NAFLD and Liver Inflammation Exacerbated in PPAR- α Knockout Mice. **Journal of cellular physiology**, v. 232, n. 5, p. 1008-1019, 2017.

BECHMANN, L. P.; HANNIVOORT, R. A.; GERKEN, G. et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal of hepatology**, v. 56, n. 4, p. 952-964, 2012.

BERGERON, R.; REN, J. M.; CADMAN, K. S. et al. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 281, n. 6, p. E1340-E1346, 2001.

BIRK, J..WOJTASZEWSKI, J. Predominant $\alpha 2/\beta 2/\gamma 3$ AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 577, n. 3, p. 1021-1032, 2006.

BOLSTER, D. R.; CROZIER, S. J.; KIMBALL, S. R. et al. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 23977-23980, 2002.

BOUDABA, N.; MARION, A.; HUET, C. et al. AMPK re-activation suppresses hepatic steatosis but its downregulation does not promote fatty liver development. **EBioMedicine**, v. 28, p. 194-209, 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRONNER, M.; HERTZ, R..BAR-TANA, J. Kinase-independent transcriptional co-activation of peroxisome proliferator-activated receptor α by AMP-activated protein kinase. **Biochemical Journal**, v. 384, n. 2, p. 295-305, 2004.

CABRAL-SANTOS, C.; GEROSA-NETO, J.; INOUE, D. S. et al. Similar Anti-Inflammatory Acute responses from moderate-intensity continuous and high-intensity intermittent exercise. **Journal of sports science & medicine**, v. 14, n. 4, p. 849, 2015.

CAMACHO, R. C.; DONAHUE, E. P.; JAMES, F. D. et al. Energy state of the liver during short-term and exhaustive exercise in C57BL/6J mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 3, p. E405-E408, 2006.

CANTÓ, C.; JIANG, L. Q.; DESHMUKH, A. S. et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. **Cell metabolism**, v. 11, n. 3, p. 213-219, 2010.

CARLING, D.; AGUAN, K.; WOODS, A. et al. Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 15, p. 11442-11448, 1994.

CARLING, D.; CLARKE, P. R.; ZAMMIT, V. A. et al. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase: Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. **European journal of biochemistry**, v. 186, n. 1-2, p. 129-136, 1989.

CARLING, D.; THORNTON, C.; WOODS, A. et al. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? **Biochemical Journal**, v. 445, n. 1, p. 11-27, 2012.

CARLSON, C. A.; KIM, K.-H. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 1, p. 378-380, 1973.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 2005-2023, 2012.

CHEUNG, P. C.; SALT, I. P.; DAVIES, S. P. et al. Characterization of AMP-activated protein kinase γ -subunit isoforms and their role in AMP binding. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 3, p. 659-669, 2000.

CHO, J.; KIM, S.; LEE, S. et al. Effect of training intensity on nonalcoholic fatty liver disease. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 47, n. 8, p. 1624-1634, 2015.

CHO, J.; LEE, I.; KIM, D. et al. Effect of aerobic exercise training on non-alcoholic fatty liver disease induced by a high fat diet in C57BL/6 mice. **Journal of exercise nutrition & biochemistry**, v. 18, n. 4, p. 339, 2014.

CHOI, R. H.; MCCONAHAY, A.; JOHNSON, M. B. et al. Adipose tissue-specific knockout of AMPK α 1/ α 2 results in normal AICAR tolerance and glucose metabolism. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 519, n. 3, p. 633-638, 2019.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

COPPS, K. D.; HANÇER, N. J.; QIU, W. et al. Serine 302 phosphorylation of mouse insulin receptor substrate 1 (IRS1) is dispensable for normal insulin signaling and feedback regulation by hepatic S6 kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 16, p. 8602-8617, 2016.

CORTON, J. M.; GILLESPIE, J. G.; HAWLEY, S. A. et al. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. **European journal of biochemistry**, v. 229, n. 2, p. 558-565, 1995.

CRANE, J. D.; MACNEIL, L. G.; LALLY, J. S. et al. Exercise-stimulated interleukin-15 is controlled by AMPK and regulates skin metabolism and aging. **Aging cell**, v. 14, n. 4, p. 625-634, 2015.

DADSON, K.; TURDI, S.; HASHEMI, S. et al. Adiponectin is required for cardiac MEF2 activation during pressure overload induced hypertrophy. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 86, p. 102-109, 2015.

DAVIES, S. P.; HAWLEY, S. A.; WOODS, A. et al. Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP- γ -Sepharose and analysis of its subunit structure. **European journal of biochemistry**, v. 223, n. 2, p. 351-357, 1994.

DE SOUZA, C. O.; TEIXEIRA, A. A.; BIONDO, L. A. et al. Palmitoleic acid improves metabolic functions in fatty liver by PPAR α -dependent AMPK activation. **Journal of cellular physiology**, v. 232, n. 8, p. 2168-2177, 2017.

DE SOUZA, C. O.; TEIXEIRA, A. A.; BIONDO, L. A. et al. Palmitoleic acid reduces high fat diet-induced liver inflammation by promoting PPAR- γ -independent M2a polarization of myeloid cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 10, p. 158776, 2020.

DELA PEÑA, A.; LECLERCQ, I.; FIELD, J. et al. NF- κ B activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. **Gastroenterology**, v. 129, n. 5, p. 1663-1674, 2005.

DENG, B.; WEHLING-HENRICKS, M.; VILLALTA, S. A. et al. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 7, p. 3669-3680, 2012.

DINIZ, T. A.; DE LIMA JUNIOR, E. A.; TEIXEIRA, A. A. et al. Aerobic training improves NAFLD markers and insulin resistance through AMPK-PPAR- α signaling in obese mice. **Life Sciences**, v. 266, p. 118868, 2021.

DZAMKO, N.; VAN DENDEREN, B. J.; HEVENER, A. L. et al. AMPK β 1 deletion reduces appetite, preventing obesity and hepatic insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 1, p. 115-122, 2010.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metab**, v. 17, n. 2, p. 162-84, 2013.

FANALE, D.; AMODEO, V.; CARUSO, S. **The interplay between metabolism, PPAR signaling pathway, and cancer**: Hindawi 2017.

FENTZ, J.; KJØBSTED, R.; BIRK, J. B. et al. AMPK α is critical for enhancing skeletal muscle fatty acid utilization during in vivo exercise in mice. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 5, p. 1725-1738, 2015.

FERREIRA, J. C.; ROLIM, N. P.; BARTHOLOMEU, J. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760-765, 2007.

FIASCHI, T.; GIANNONI, E.; TADDEI, M. L. et al. Globular adiponectin activates motility and regenerative traits of muscle satellite cells. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e34782, 2012.

FIASCHI, T.; MAGHERINI, F.; GAMBERI, T. et al. Adiponectin as a tissue regenerating hormone: more than a metabolic function. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 10, p. 1917-1925, 2014.

FIASCHI, T.; TEDESCO, F. S.; GIANNONI, E. et al. Globular adiponectin as a complete mesoangioblast regulator: role in proliferation, survival, motility, and skeletal muscle differentiation. **Molecular biology of the cell**, v. 21, n. 6, p. 848-859, 2010.

FLETCHER, J. A.; MEERS, G. M.; LINDEN, M. A. et al. Impact of various exercise modalities on hepatic mitochondrial function. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 46, n. 6, p. 1089, 2014.

FOLCH, J.; SAKURA, J. Preparation of the proteolipid apoprotein from bovine heart, liver and kidney. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 427, n. 2, p. 410-427, 1976.

FORETZ, M.; ANCELLIN, N.; ANDREELLI, F. et al. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. **Diabetes**, v. 54, n. 5, p. 1331-1339, 2005.

FORETZ, M.; EVEN, P. C.; VIOLLET, B. AMPK activation reduces hepatic lipid content by increasing fat oxidation in vivo. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2826, 2018.

FORETZ, M.; VIOLLET, B. Regulation of hepatic metabolism by AMPK. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 827-9, 2011.

FORTES, M. A. S.; MARZUCA-NASSR, G. N.; VITZEL, K. F. et al. Housekeeping proteins: how useful are they in skeletal muscle diabetes studies and muscle hypertrophy models? **Analytical biochemistry**, v. 504, p. 38-40, 2016.

FOULDS, C. E.; TREVIÑO, L. S.; YORK, B. et al. Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 8, p. 445, 2017.

FRIEDRICHSEN, M.; MORTENSEN, B.; PEHMØLLER, C. et al. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 366, n. 2, p. 204-214, 2013.

FUENTE, P.-D. L. F.; QUEZADA, L.; SEPÚLVEDA, C. et al. Exercise regulates lipid droplet dynamics in normal and fatty liver. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1864, n. 12, p. 158519, 2019.

FUJII, N.; HAYASHI, T.; HIRSHMAN, M. F. et al. Exercise induces isoform-specific increase in 5' AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 273, n. 3, p. 1150-1155, 2000.

FUJISAKA, S.; USUI, I.; IKUTANI, M. et al. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1alpha-dependent and HIF-1alpha-independent manner in obese mice. **Diabetologia**, v. 56, n. 6, p. 1403-12, 2013.

FURRER, R.; EISELE, P. S.; SCHMIDT, A. et al. Paracrine cross-talk between skeletal muscle and macrophages in exercise by PGC-1 α -controlled BNP. **Scientific reports**, v. 7, p. 40789, 2017.

GALIC, S.; FULLERTON, M. D.; SCHERTZER, J. D. et al. Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 12, p. 4903-4915, 2011.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**, v. 316, n. 2, p. 129-39, 2010.

GAMBLE, K. L.; BERRY, R.; FRANK, S. J. et al. Circadian clock control of endocrine factors. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 8, p. 466-475, 2014.

GARCIA, D.; HELLBERG, K.; CHAIX, A. et al. Genetic liver-specific AMPK activation protects against diet-induced obesity and NAFLD. **Cell reports**, v. 26, n. 1, p. 192-208. e6, 2019.

GENG, T.; LI, P.; OKUTSU, M. et al. PGC-1 α plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, n. 3, p. C572-9, 2010.

GIRAUD, J.; LESHAN, R.; LEE, Y.-H. et al. Nutrient-dependent and insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine 302 correlates with increased insulin signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 5, p. 3447-3454, 2004.

GLUND, S.; TREEBAK, J. T.; LONG, Y. C. et al. Role of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in interleukin-6 release from isolated mouse skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 600-606, 2009.

GU, Q.; YANG, X.; LIN, L. et al. Genetic ablation of solute carrier family 7a3a leads to hepatic steatosis in zebrafish during fasting. **Hepatology**, v. 60, n. 6, p. 1929-1941, 2014.

HAWLEY, S. A.; BOUDEAU, J.; REID, J. L. et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. **Journal of biology**, v. 2, n. 4, p. 1-16, 2003.

HAWLEY, S. A.; DAVISON, M.; WOODS, A. et al. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 44, p. 27879-27887, 1996.

HAWLEY, S. A.; SELBERT, M. A.; GOLDSTEIN, E. G. et al. 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 45, p. 27186-27191, 1995.

HE, C.; LI, H.; VIOLLET, B. et al. AMP-activated Protein Kinase Suppresses Vascular Inflammation in vivo by Inhibiting Signal Transducer and Activator of Transcription-1. **Diabetes**, p. db150107, 2015.

HERZIG, S.; SHAW, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 2, p. 121-135, 2018.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (N Y)**, v. 10, n. 4, p. 413-7, 1992.

HOSOOKA, T.; NOGUCHI, T.; KOTANI, K. et al. Dok1 mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and obesity through modulation of PPAR-gamma phosphorylation. **Nat Med**, v. 14, n. 2, p. 188-93, 2008.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177-185, 2017.

HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-8, 1996.

HSU, P. P.; KANG, S. A.; RAMESEDER, J. et al. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1317-1322, 2011.

IMBEAULT, P.; DEPAULT, I. HAMAN, F. Cold exposure increases adiponectin levels in men. **Metabolism: Clinical & Experimental**, v. 58, n. 4, p. 552-9, 2009.

IWABU, M.; YAMAUCHI, T.; OKADA-IWABU, M. et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1313, 2010.

JÄGER, S.; HANDSCHIN, C.; PIERRE, J. S.-. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 12017-12022, 2007.

JEYAKUMAR, S. M.; VAJRESWARI, A. GIRIDHARAN, N. V. Chronic dietary vitamin A supplementation regulates obesity in an obese mutant WNIN/Ob rat model. **Obesity**, v. 14, n. 1, p. 52-59, 2006.

JIAO, M.; REN, F.; ZHOU, L. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α activation attenuates the inflammatory response to protect the liver from acute failure by promoting the autophagy pathway. **Cell death & disease**, v. 5, n. 8, p. e1397, 2014.

JØRGENSEN, S. B.; NIELSEN, J. N.; BIRK, J. B. et al. The α 2-5' AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading. **Diabetes**, v. 53, n. 12, p. 3074-3081, 2004a.

JØRGENSEN, S. B.; VIOLLET, B.; ANDREELLI, F. et al. Knockout of the α 2 but not α 1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 2, p. 1070-1079, 2004b.

JURIMAE, J.; PURGE, P. JURIMAE, T. Adiponectin is altered after maximal exercise in highly trained male rowers. **Eur J Appl Physiol**, v. 93, n. 4, p. 502-5, 2005.

KANDA, H.; TATEYA, S.; TAMORI, Y. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p. 1494-505, 2006.

KAWANISHI, N.; MIZOKAMI, T.; NIIHARA, H. et al. Macrophage depletion by clodronate liposome attenuates muscle injury and inflammation following exhaustive exercise. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 5, p. 146-151, 2016.

KAWANISHI, N.; YANO, H.; MIZOKAMI, T. et al. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 26, n. 6, p. 931-941, 2012.

KELLENDONK, C.; OPPERK, C.; ANLAG, K. et al. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. **genesis**, v. 26, n. 2, p. 151-153, 2000.

KELLER, C.; STEENSBERG, A.; PILEGAARD, H. et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 14, p. 2748-2750, 2001.

KJØBSTED, R.; HINGST, J. R.; FENTZ, J. et al. AMPK in skeletal muscle function and metabolism. **The FASEB journal**, v. 32, n. 4, p. 1741-1777, 2018.

KNUDSEN, J. G.; GUDIENSEN, A.; BERTHOLDT, L. et al. Skeletal muscle IL-6 regulates muscle substrate utilization and adipose tissue metabolism during recovery from an acute bout of exercise. **PLoS one**, v. 12, n. 12, p. e0189301, 2017.

KNUDSEN, N. H.; STANYA, K. J.; HYDE, A. L. et al. Interleukin-13 drives metabolic conditioning of muscle to endurance exercise. **Science**, v. 368, n. 6490, 2020.

KOELWYN, G. J.; QUAIL, D. F.; ZHANG, X. et al. Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 10, p. 620-632, 2017.

KRAEMER, R. R.; ABOUDEHEN, K. S.; CARRUTH, A. K. et al. Adiponectin responses to continuous and progressively intense intermittent exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 35, n. 8, p. 1320-1325, 2003.

KRAUSE, M. P.; LIU, Y.; VU, V. et al. Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 1, p. C203-C212, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LANTIER, L.; FENTZ, J.; MOUNIER, R. et al. AMPK controls exercise endurance, mitochondrial oxidative capacity, and skeletal muscle integrity. **The FASEB Journal**, v. 28, n. 7, p. 3211-3224, 2014.

LANTIER, L.; WILLIAMS, A. S.; WILLIAMS, I. M. et al. Reciprocity between skeletal muscle AMPK deletion and insulin action in diet-induced obese mice. **Diabetes**, v. 69, n. 8, p. 1636-1649, 2020.

LAURITZEN, H. P.; BRANDAUER, J.; SCHJERLING, P. et al. Contraction and AICAR stimulate IL-6 vesicle depletion from skeletal muscle fibers in vivo. **Diabetes**, v. 62, n. 9, p. 3081-3092, 2013.

LEICK, L.; WOJTASZEWSKI, J. F.; JOHANSEN, S. T. et al. PGC-1 α is not mandatory for exercise- and training-induced adaptive gene responses in mouse skeletal muscle. **American journal of physiology-endocrinology and metabolism**, v. 294, n. 2, p. E463-E474, 2008.

LI, H.; MIN, Q.; OUYANG, C. et al. AMPK activation prevents excess nutrient-induced hepatic lipid accumulation by inhibiting mTORC1 signaling and endoplasmic reticulum stress response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 9, p. 1844-1854, 2014.

LI, Y.; SUN, R.; ZOU, J. et al. Dual roles of the AMP-activated protein kinase pathway in angiogenesis. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 752, 2019.

LI, Y.; XU, S.; MIHAYLOVA, M. M. et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. **Cell metabolism**, v. 13, n. 4, p. 376-388, 2011.

LIANG, W.; MENKE, A. L.; DRIESSEN, A. et al. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e115922, 2014.

LIN, S.-C.; HARDIE, D. G. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. **Cell metabolism**, 2017.

LIPOVKA, Y.; KONHILAS, J. P. AMP-activated protein kinase signalling in cancer and cardiac hypertrophy. **Cardiovascular pharmacology: open access**, v. 4, n. 3, 2015.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 2, p. 17023, 2017.

LIU, W.-X.; WANG, T.; ZHOU, F. et al. Voluntary exercise prevents colonic inflammation in high-fat diet-induced obese mice by up-regulating PPAR- γ activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 459, n. 3, p. 475-480, 2015.

LIU, W..SAINT, D. A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 294, n. 2, p. 347-353, 2002.

LIU, Y.; CHEWCHUK, S.; LAVIGNE, C. et al. Functional significance of skeletal muscle adiponectin production, changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 3, p. E657-E664, 2009.

LOOMBA, R..SANYAL, A. J. The global NAFLD epidemic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 10, n. 11, p. 686, 2013.

LOWE, C. E.; O'RAHILLY, S..ROCHFORD, J. J. Adipogenesis at a glance. **J cell sci**, v. 124, n. 16, p. 2681-2686, 2011.

LUCONI, M.; CANTINI, G..SERIO, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): is the genomic activity the only answer? **Steroids**, v. 75, n. 8-9, p. 585-594, 2010.

MA, G.-D.; LIU, Y.-H.; ZHANG, Q.-L. et al. Pre-endurance training prevents acute alcoholic liver injury in rats through the regulation of damaged mitochondria accumulation and mitophagy balance. **Hepatology international**, v. 8, n. 3, p. 425-435, 2014.

MA, K.; CABRERO, A.; SAHA, P. K. et al. Increased β -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 34658-34661, 2002.

MACDONALD, C.; WOJTASZEWSKI, J. F.; PEDERSEN, B. K. et al. Interleukin-6 release from human skeletal muscle during exercise: relation to AMPK activity. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 6, p. 2273-2277, 2003.

MAHONEY, D. J.; CAREY, K.; FU, M.-H. et al. Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. **Physiological genomics**, v. 18, n. 2, p. 226-231, 2004.

MATTHEWS, V. B.; ÅSTRÖM, M.-B.; CHAN, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1409-1418, 2009.

MENG, R.; PEI, Z.; ZHANG, A. et al. AMPK activation enhances PPAR α activity to inhibit cardiac hypertrophy via ERK1/2 MAPK signaling pathway. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 511, n. 1-2, p. 1-7, 2011.

MERRILL, G.; KURTH, E.; HARDIE, D. et al. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 273, n. 6, p. E1107-E1112, 1997.

MICHELOTTI, G. A.; MACHADO, M. V..DIEHL, A. M. NAFLD, NASH and liver cancer. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 11, p. 656-665, 2013.

MITCHELHILL, K. I.; STAPLETON, D.; GAO, G. et al. Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 4, p. 2361-2364, 1994.

MORA-RODRIGUEZ, R.; ORTEGA, J.; HAMOUTI, N. et al. Time-course effects of aerobic interval training and detraining in patients with metabolic syndrome. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 24, n. 7, p. 792-798, 2014.

MORÁN-SALVADOR, E.; TITOS, E.; RIUS, B. et al. Cell-specific PPAR γ deficiency establishes anti-inflammatory and anti-fibrogenic properties for this nuclear receptor in non-parenchymal liver cells. **Journal of hepatology**, v. 59, n. 5, p. 1045-1053, 2013.

MORETTO, T. L.; BENFATO, I. D.; DE CARVALHO, F. P. et al. The effects of calorie-matched high-fat diet consumption on spontaneous physical activity and development of obesity. **Life Sciences**, v. 179, p. 30-36, 2017.

MOUNIER, R.; THÉRET, M.; LANTIER, L. et al. Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 6, p. 275-286, 2015.

MU, J.; BROZINICK JR, J. T.; VALLADARES, O. et al. A role for AMP-activated protein kinase in contraction-and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. **Molecular cell**, v. 7, n. 5, p. 1085-1094, 2001.

MUNDAY, M. R.; CAMPBELL, D. G.; CARLING, D. et al. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. **European journal of biochemistry**, v. 175, n. 2, p. 331-338, 1988.

MUSI, N.; FUJII, N.; HIRSHMAN, M. F. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 921-927, 2001.

NUMAO, S.; KATAYAMA, Y.; HAYASHI, Y. et al. Influence of acute aerobic exercise on adiponectin oligomer concentrations in middle-aged abdominally obese men. **Metabolism: Clinical & Experimental**, v. 60, n. 2, p. 186-94, 2011.

O'NEILL, H. M.; MAARBJERG, S. J.; CRANE, J. D. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) β 1 β 2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 16092-16097, 2011.

O'NEILL, H. M.; HOLLOWAY, G. P.; STEINBERG, G. R. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: implications for obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 366, n. 2, p. 135-151, 2013.

OAKHILL, J. S.; CHEN, Z.-P.; SCOTT, J. W. et al. β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 45, p. 19237-19241, 2010.

OAKHILL, J. S.; STEEL, R.; CHEN, Z.-P. et al. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. **Science**, v. 332, n. 6036, p. 1433-1435, 2011.

OJAIMI, J.; MASTERS, C. L.; OPESKIN, K. et al. Mitochondrial respiratory chain activity in the human brain as a function of age. **Mechanisms of ageing and development**, v. 111, n. 1, p. 39-47, 1999.

OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ASP, S. et al. Pro-and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **The Journal of physiology**, v. 515, n. 1, p. 287-291, 1999.

OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ZACHO, M. et al. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. **The Journal of physiology**, v. 508, n. 3, p. 949-953, 1998.

OVENS, A. J.; SCOTT, J. W.; LANGENDORF, C. G. et al. Post-Translational Modifications of the Energy Guardian AMP-Activated Protein Kinase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1229, 2021.

PAREJA-GALEANO, H.; GARATACHEA, N.; LUCIA, A. Exercise as a polypill for chronic diseases. In: (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**: Elsevier, v.135, 2015. p.497-526. ISBN 1877-1173.

PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAELS, B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of hepatology**, v. 62, n. 3, p. 720-733, 2015.

PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. **Essays Biochem**, v. 42, p. 105-117, 2006.

_____. The disease of physical inactivity--and the role of myokines in muscle-fat cross talk. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 23, p. 5559-68, 2009.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1379-406, 2008.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457-465, 2012.

PEDERSEN, B. K.; STEENBERG, A.; KELLER, P. et al. Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. **Pflügers Archiv**, v. 446, n. 1, p. 9-16, 2003.

PELLICORO, A.; RAMACHANDRAN, P.; IREDALE, J. P. et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 181, 2014.

PETRIDOU, E.; MANTZOROS, C.; DESSYPRIS, N. et al. Plasma adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer: a case-control study in Greece. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 3, p. 993-997, 2003.

POSTIC, C.; SHIOTA, M.; NISWENDER, K. D. et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 1, p. 305-315, 1999.

RIGAMONTI, E.; ZORDAN, P.; SCIORATI, C. et al. Macrophage plasticity in skeletal muscle repair. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

RITCHIE, I. R.; MACDONALD, T. L.; WRIGHT, D. C. et al. Adiponectin is sufficient, but not required, for exercise-induced increases in the expression of skeletal muscle mitochondrial enzymes. **The Journal of physiology**, v. 592, n. 12, p. 2653-2665, 2014.

ROMERO-GÓMEZ, M.; ZELBER-SAGI, S.; TRENELL, M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. **Journal of hepatology**, v. 67, n. 4, p. 829-846, 2017.

ROMICS, L.; KODYS, K.; DOLGANIUC, A. et al. Diverse regulation of NF- κ B and peroxisome proliferator-activated receptors in murine nonalcoholic fatty liver. **Hepatology**, v. 40, n. 2, p. 376-385, 2004.

SAG, D.; CARLING, D.; STOUT, R. D. et al. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8633-8641, 2008.

SALANS, L. B.; HORTON, E. S.; SIMS, E. A. Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 5, p. 1005, 1971.

SEVERINSEN, M. C. K.; PEDERSEN, B. K. Muscle–organ crosstalk: the emerging roles of myokines. **Endocrine reviews**, v. 41, n. 4, p. 594-609, 2020.

SHAPIRO, A. L.; VINUELA, E.; MAIZEL, J. V., JR. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 28, n. 5, p. 815-20, 1967.

SHAW, R. J.; KOSMATKA, M.; BARDEESY, N. et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3329-3335, 2004.

SHEN, Y.; ZHOU, H.; JIN, W. et al. Acute exercise regulates adipogenic gene expression in white adipose tissue. **Biology of Sport**, v. 33, n. 4, p. 381, 2016.

SIMPSON, K. A.; SINGH, M. A. Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 2, p. 241-56, 2008.

STAELS, B.; RUBENSTRUNK, A.; NOEL, B. et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 58, n. 6, p. 1941-1952, 2013.

STAPLETON, D.; MITCHELHILL, K. I.; MICHELL, B. J. et al. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily (*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 2, p. 611-614, 1996.

STEENSBERG, A.; VAN HALL, G.; OSADA, T. et al. **Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6**: Wiley Online Library 2000.

STEIN, S. C.; WOODS, A.; JONES, N. A. et al. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. **Biochemical Journal**, v. 345, n. 3, p. 437-443, 2000.

STEINBERG, G. R.; KEMP, B. E. AMPK in health and disease. **Physiological reviews**, v. 89, n. 3, p. 1025-1078, 2009.

SUN, L.; SHEN, W.; LIU, Z. et al. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life sciences**, v. 86, n. 1-2, p. 39-44, 2010.

TANNER, C. B.; MADSEN, S. R.; HALLOWELL, D. M. et al. Mitochondrial and performance adaptations to exercise training in mice lacking skeletal muscle LKB1. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 8, p. E1018-E1029, 2013.

THOMAS, A. W.; DAVIES, N. A.; MOIR, H. et al. Exercise-associated generation of PPAR γ ligands activates PPAR γ signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. **Journal of applied physiology**, v. 112, n. 5, p. 806-815, 2012.

THOMSON, D. M..WINDER, W. W. AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. **Acta physiologica**, v. 196, n. 1, p. 147-154, 2009.

TIDBALL, J. G..VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 5, p. R1173-R1187, 2010.

TOMAS, E.; TSAO, T.-S.; SAHA, A. K. et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 25, p. 16309-16313, 2002.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T..GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 1-21, 2013.

TRAYHURN, P..BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proc Nutr Soc**, v. 60, n. 3, p. 329-39, 2001.

TREEBAK, J. T.; BIRK, J. B.; ROSE, A. J. et al. AS160 phosphorylation is associated with activation of $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ -but not $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ -AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 3, p. E715-E722, 2007.

UM, J.-H.; PARK, S.-J.; KANG, H. et al. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. **Diabetes**, v. 59, n. 3, p. 554-563, 2010.

VAN GAAL, L. F.; MERTENS, I. L..CHRISTOPHE, E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 875-880, 2006.

VIGITEL. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Brasília DF: Ministério da Saúde**, 2013.

VIOLLET, B.; ANDREELLI, F.; JØRGENSEN, S. B. et al. The AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 1, p. 91-98, 2003.

VIOLLET, B.; ATHEA, Y.; MOUNIER, R. et al. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 19, 2009a.

VIOLLET, B.; FORETZ, M.; GUIGAS, B. et al. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. **The Journal of physiology**, v. 574, n. 1, p. 41-53, 2006.

VIOLLET, B.; GUIGAS, B.; LECLERC, J. et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. **Acta physiologica**, v. 196, n. 1, p. 81-98, 2009b.

WANG, Y.; AN, H.; LIU, T. et al. Metformin improves mitochondrial respiratory activity through activation of AMPK. **Cell reports**, v. 29, n. 6, p. 1511-1523. e5, 2019.

WEIGERT, C.; DÜFER, M.; SIMON, P. et al. Upregulation of IL-6 mRNA by IL-6 in skeletal muscle cells: role of IL-6 mRNA stabilization and Ca²⁺-dependent mechanisms. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 3, p. C1139-C1147, 2007.

WINDER, W.; AROGYASAMI, J.; ELAYAN, I. et al. Time course of exercise-induced decline in malonyl-CoA in different muscle types. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 259, n. 2, p. E266-E271, 1990.

WINDER, W.; HARDIE, D. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 270, n. 2, p. E299-E304, 1996.

WINDER, W.; HOLMES, B.; RUBINK, D. et al. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, v. 88, n. 6, p. 2219-2226, 2000.

WINDER, W. W. Malonyl-CoA--regulator of fatty acid oxidation in muscle during exercise. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 26, p. 117-132, 1998.

WOJTASZEWSKI, J. F.; BIRK, J. B.; FRØSIG, C. et al. 5' AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. **The Journal of physiology**, v. 564, n. 2, p. 563-573, 2005.

WOJTASZEWSKI, J. F.; NIELSEN, P.; HANSEN, B. F. et al. Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 528, n. 1, p. 221-226, 2000.

WOODS, A.; JOHNSTONE, S. R.; DICKERSON, K. et al. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. **Current biology**, v. 13, n. 22, p. 2004-2008, 2003.

WOODS, A.; SALT, I.; SCOTT, J. et al. The $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. **FEBS letters**, v. 397, n. 2-3, p. 347-351, 1996.

WOODS, A.; WILLIAMS, J. R.; MUCKETT, P. J. et al. Liver-specific activation of AMPK prevents steatosis on a high-fructose diet. **Cell reports**, v. 18, n. 13, p. 3043-3051, 2017.

WU, J.; PUPPALA, D.; FENG, X. et al. Chemoproteomic analysis of intertissue and interspecies isoform diversity of AMP-activated protein kinase (AMPK). **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 50, p. 35904-35912, 2013.

WU, W.; FENG, J.; JIANG, D. et al. AMPK regulates lipid accumulation in skeletal muscle cells through FTO-dependent demethylation of N 6-methyladenosine. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41606, 2017.

WUNDERLICH, C. M.; HÖVELMEYER, N.; WUNDERLICH, F. T. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. **Jak-stat**, v. 2, n. 2, p. e23878, 2013.

YAMAUCHI, T.; IWABU, M.; OKADA-IWABU, M. et al. Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 28, n. 1, p. 15-23, 2014.

ZELBER-SAGI, S.; NITZAN-KALUSKI, D.; HALPERN, Z. et al. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. **Liver Int**, v. 26, n. 7, p. 856-63, 2006.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, 1994.

ZHAO, P.; SUN, X.; CHAGGAN, C. et al. An AMPK–caspase-6 axis controls liver damage in nonalcoholic steatohepatitis. **Science**, v. 367, n. 6478, p. 652-660, 2020.

ZHENG, F.; CAI, Y. Concurrent exercise improves insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease by upregulating PPAR- γ and genes involved in the beta-oxidation of fatty acids in ApoE-KO mice fed a high-fat diet. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2019.

ZONG, H.; REN, J. M.; YOUNG, L. H. et al. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 99, n. 25, p. 15983-15987, 2002.

8. FIGURAS E LEGENDAS

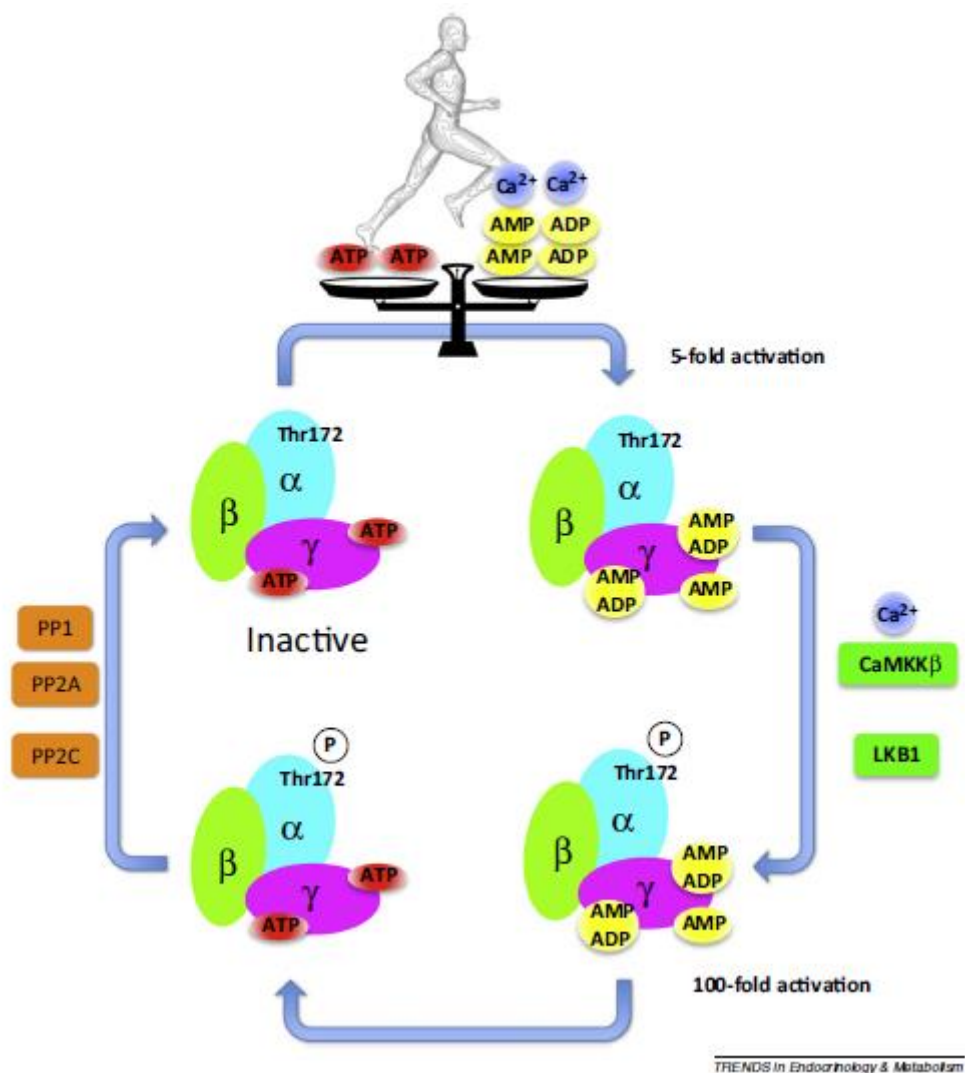


Figura 1. Regulação da AMPK pelo exercício físico.

Após a contração muscular, os níveis intracelulares de AMP, ADP e Ca^{2+} aumentam. O aumento de Ca^{2+} sinaliza e ativa a proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKK β) que fosforila a subunidade α catalítica da AMPK no resíduo de Thr172, enquanto que o AMP e ADP se ligam à subunidade γ ocasionando uma mudança conformacional na estrutura da AMPK permitindo a fosforilação do mesmo resíduo catalítico pela LKB1, ao mesmo tempo que protege contra a desfosforilação, mantendo a AMPK na sua conformação ativa. Depois do exercício com a ligação de trifosfato de adenosina (ATP) novamente à subunidade γ , a AMPK retorna ao seu estado inativo pela desfosforilação do seu resíduo catalítico pela ação de proteínas fosfatases (PP1, PP2A e PP2C). Adaptado de [Mounier et al. \(2015\)](#). [Clique aqui para voltar no texto.](#)

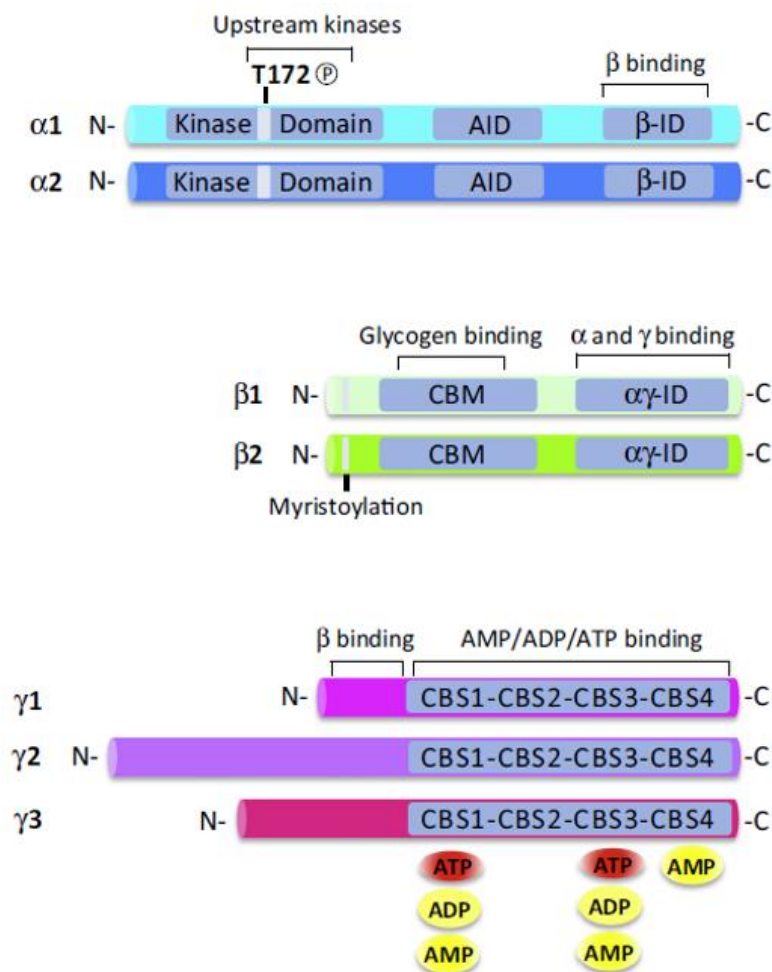


Figura 2. Subunidades, isoformas e principais domínios da AMPK.

AMPK é uma proteína heterotrímica, composta pela subunidade catalítica α e as regulatórias β e γ , as quais apresentam duas ou mais isoformas ($\alpha1/2$, $\beta1/2$ e $\gamma1/2/3$). Na subunidade α encontra-se: i) o domínio catalítico, que pode ser fosforilado por quinases upstream no resíduo Thr172; ii) um domínio auto-inibitório (AID), possivelmente relacionado à ativação do complexo; e iii) o domínio β -SID, que interage fisicamente com a subunidade β . A subunidade β apresenta: i) o domínio de interação com carboidratos (CBM); e ii) o domínio α - γ -ID, o qual se liga às subunidades α e γ . Por fim, a subunidade γ possui o quatro domínio CBS (do inglês *cystathionine β -synthase*), no qual tres deles se ligam ao AMP, ADP e ATP. Mais especificamente, CBS-2 nunca está ocupado, o CBS-4 está sempre ligado à AMP, e o CBS-1 e CBS-3 intercambiavelmente se ligam à todos os nucleotídeos. Adaptado de [Mounier et al. \(2015\)](#). [Clique aqui para voltar no texto.](#)

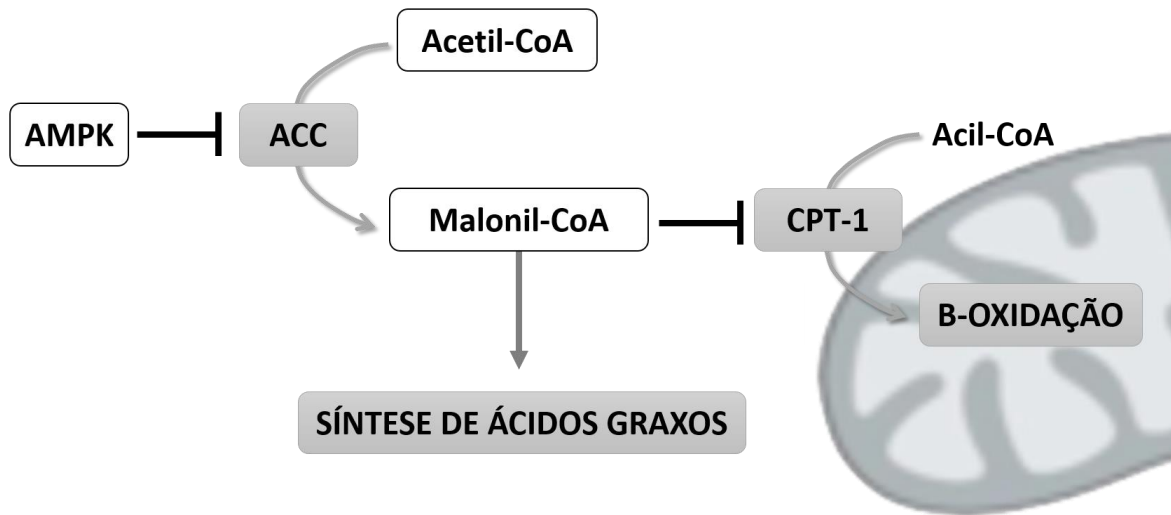


Figura 3. Regulação da oxidação de lipídios pela AMPK.

Adaptado de [Lipovka, Konhilas \(2015\)](#). [Clique aqui para voltar no texto.](#)

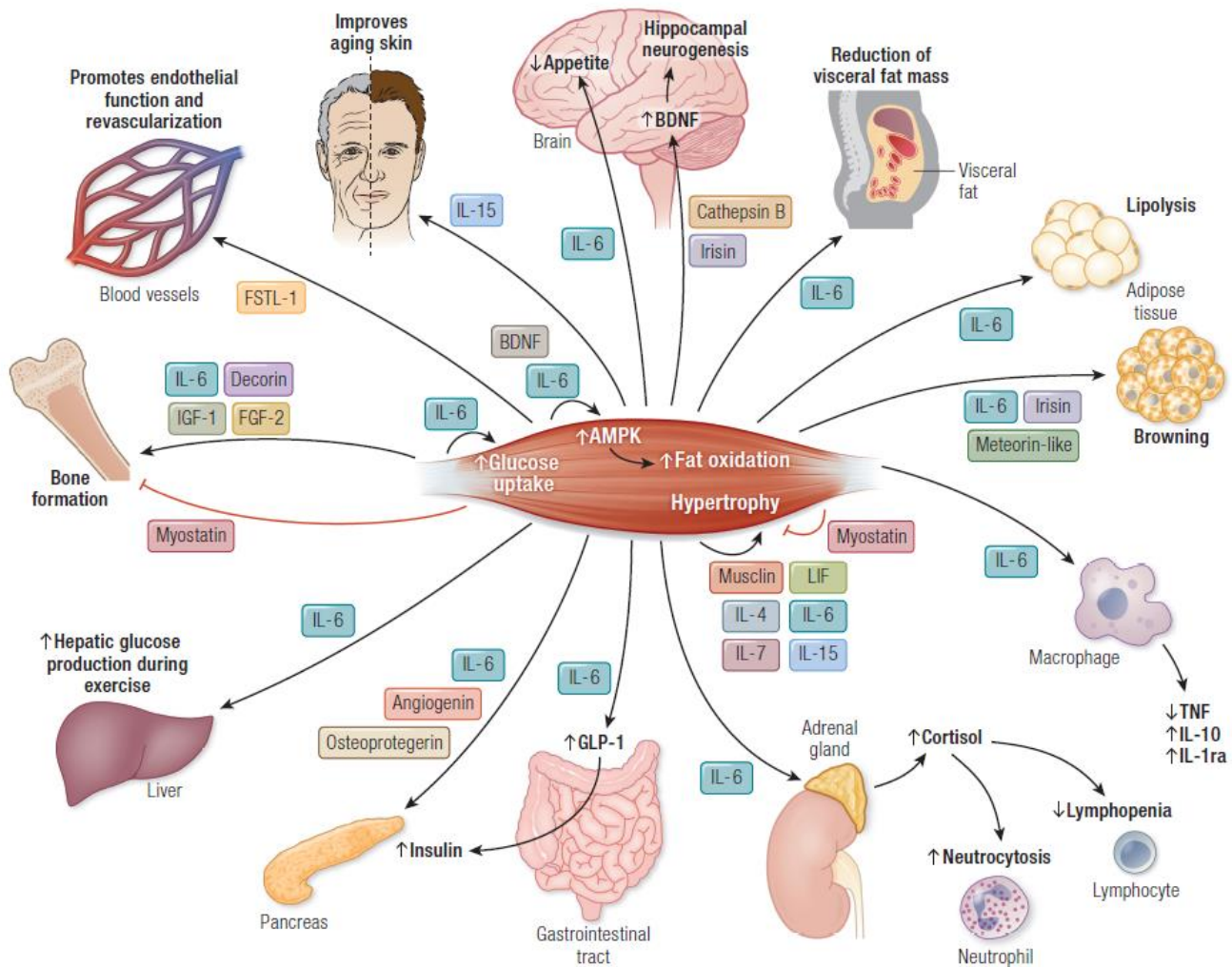


Figura 4. Comunicação músculo-órgãos.

Principais miocinas liberadas pelo músculo esquelético e suas funções em órgãos-alvo (SEVERINSEN & PEDERSEN, 2020). [Clique aqui para voltar no texto.](#)

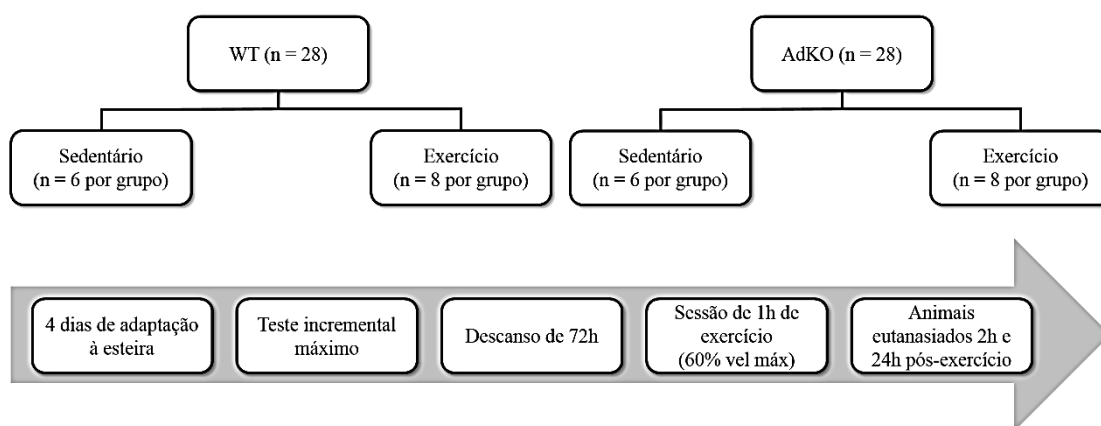


Figura 5. Desenho experimental.

WT: tipo selvagem (C57BL/6); AdKO: animais knockout para adiponectina; Vel máx: velocidade máxima atingida no teste. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

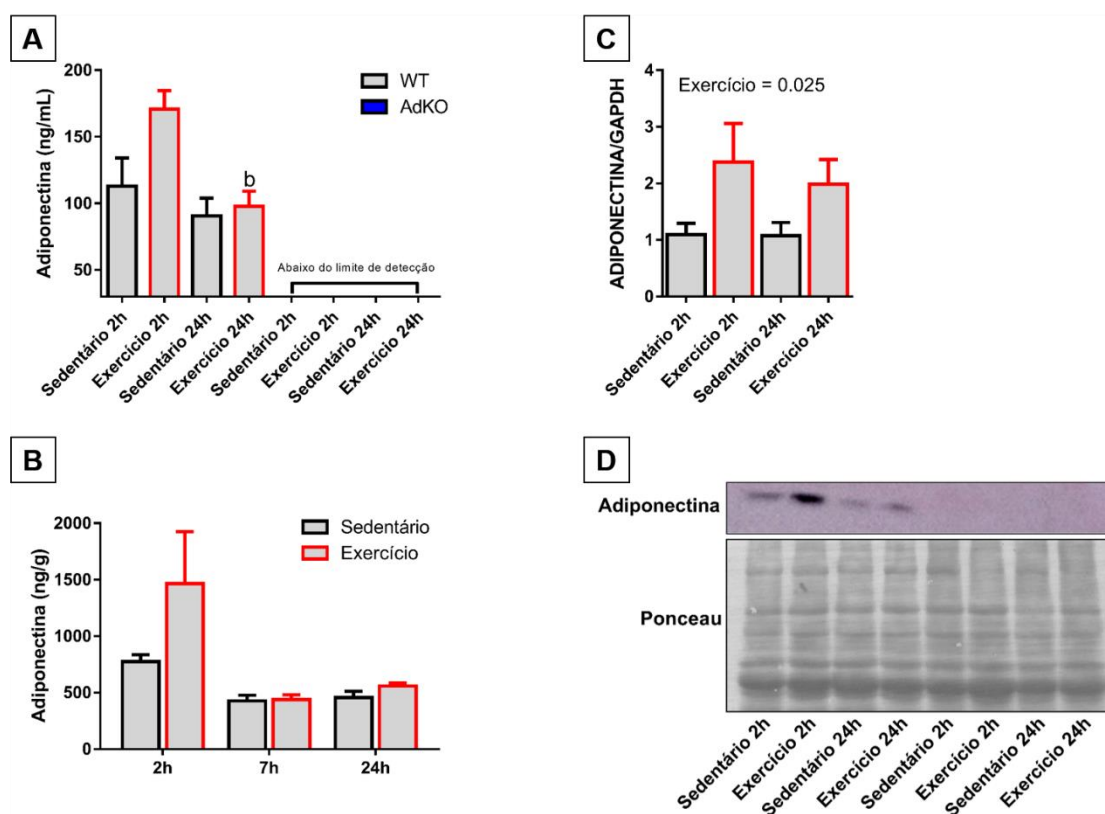


Figura 6. Efeito do exercício aeróbico agudo na contéudo proteico e expressão gênica de adiponectina no soro e gastrocnêmio de animais WT e AdKO.

(A) Concentração de adiponectina no soro. (B) Concentração de adiponectina no músculo gastrocnêmio em animais WT. (C) Expressão gênica de adiponectina no músculo gastrocnêmio. (D) Imagem representativa da análise de western blot de adiponectina no músculo gastrocnêmio. Dados expressos em média±erro-padrão. b = diferença estatística para Exercício 2h dentro do genótipo. n = 4-8 animais por grupo. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

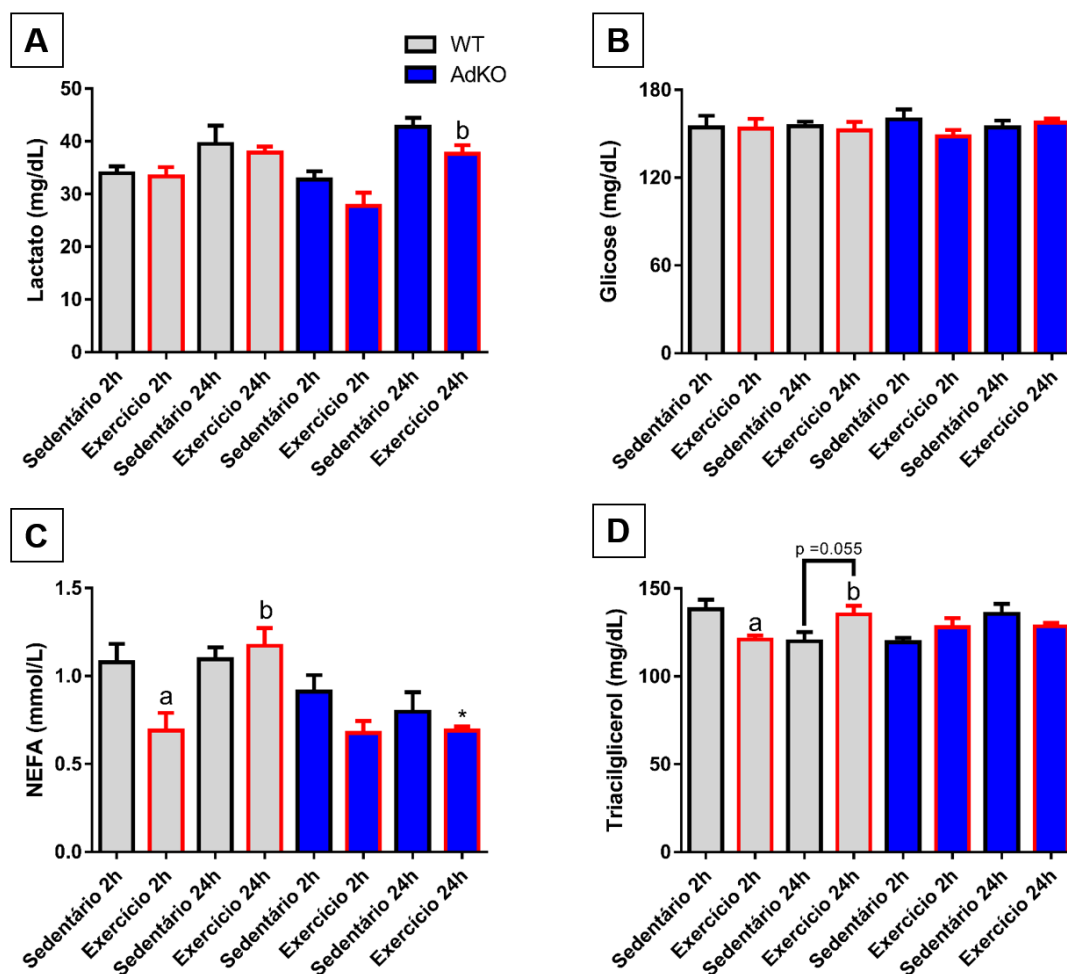


Figura 7. Diferenças entre genótipos no perfil metabólico.

(A-D) Alterações mediadas pelo exercício físico nas concentrações séricas de lactato, glicose, NEFA e triacilglicerol. Os dados foram apresentados como média \pm erro-padrão. a = significativamente diferente do grupo Sedentário 2h dentro do genótipo. b = significativamente diferente do grupo Exercício 2h dentro do genótipo. * = significativamente diferente entre genótipo no mesmo tempo. n = 6-8 camundongos por grupo. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

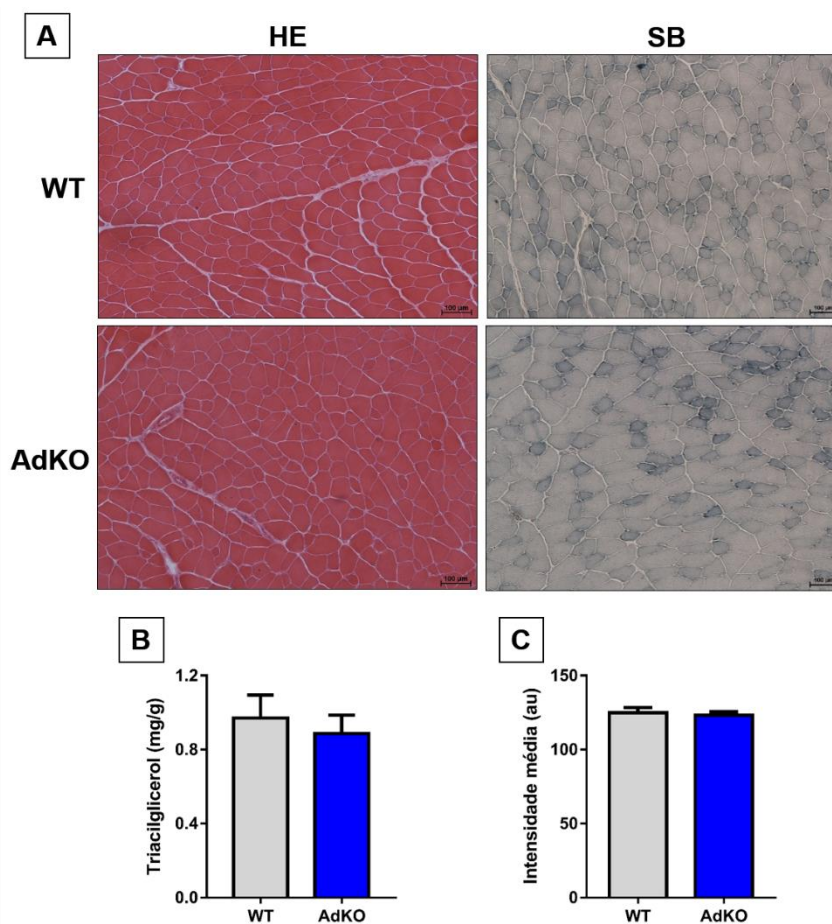


Figura 8. Diferenças entre genótipos no acúmulo muscular de lipídeos.

(A) Aspectos histológicos de camundongos WT e AdKO sob condições basais. (B) Conteúdo de triacilglicerol no gastrocnêmio. (C) Intensidade média de triacilglicerol da coloração Sudan Black (SB). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. $n = 6-8$ camundongos por grupo. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

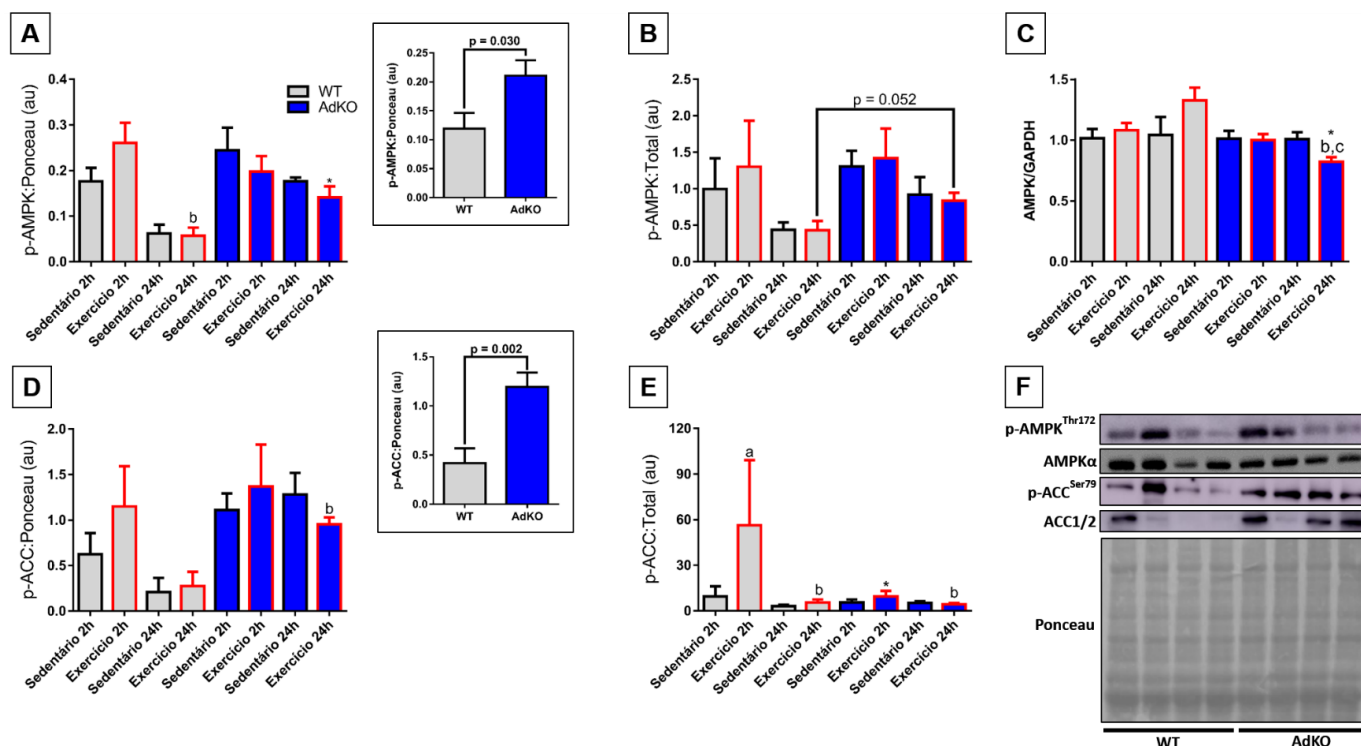


Figura 9. Camundongos AdKO apresentaram ativação de AMPK muscular alterada após exercício aeróbio agudo.

(A) Expressão de AMPK α (Thr¹⁷²) fosforilada. (B) A razão de p-AMPK α (Thr¹⁷²) e a expressão total da proteína AMPK α . (C) Expressão gênica relativa de AMPK. (D) Expressão de ACC fosforilada (Ser⁷⁹). (E) A razão de p-ACC (Ser⁷⁹) e a expressão total da proteína ACC1/2. (F) Imagens representativas da análise de *western blot* no músculo gastrocnêmio. Os dados foram apresentados como média \pm erro-padrão. b = significativamente diferente do grupo Exercício 2h dentro do genótipo. c = significativamente diferente do grupo Sedentário 24h dentro do genótipo * = significativamente diferente entre genótipo no mesmo tempo. n = 4 camundongos por grupo. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

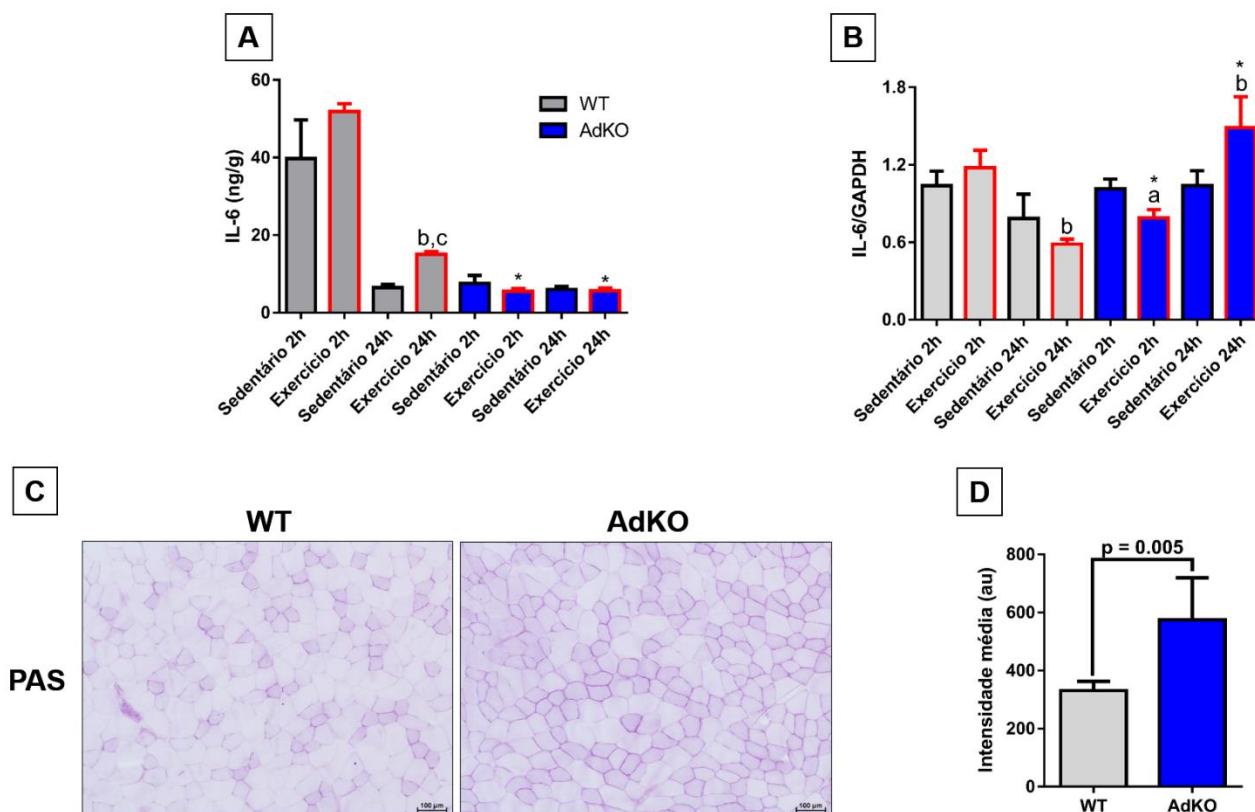


Figura 10. A expressão de proteica de IL-6 no músculo gastrocnêmio foi suprimida após o exercício físico agudo na ausência de adiponectina.

(A) Expressão proteica muscular de IL-6. (B) Expressão gênica relativa de IL-6 no músculo. (C) Conteúdo de glicogênio muscular avaliado através da coloração *Periodic acid-Schiff* (PAS). (D) Intensidade média de PAS. Os dados foram apresentados como média \pm erro-padrão. a = significativamente diferente do grupo Sedentário 2h dentro do genótipo. b = significativamente diferente do grupo Exercício 2h dentro do genótipo. c = significativamente diferente do grupo Sedentário 24h dentro do genótipo * = significativamente diferente entre genótipo no mesmo tempo. n = 6-8 camundongos por grupo. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

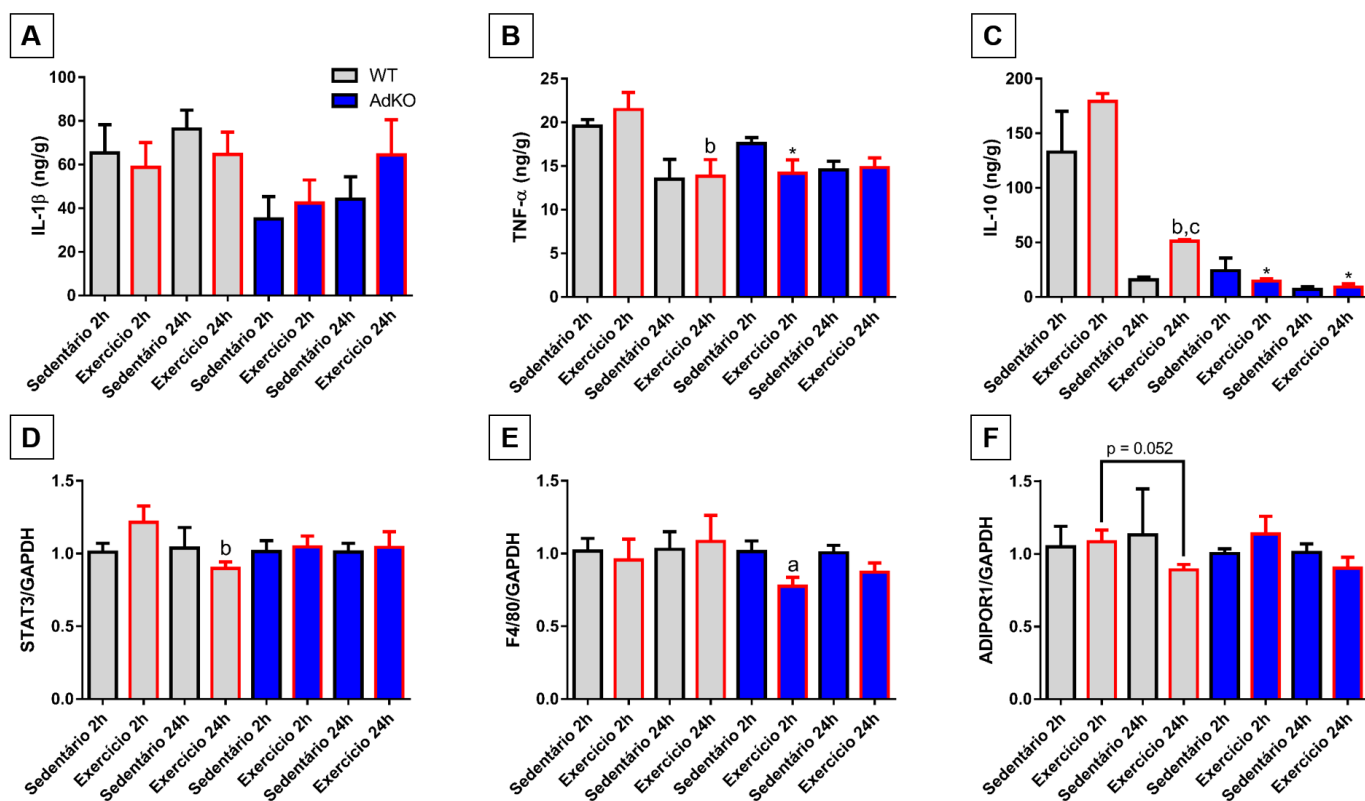


Figura 11. O exercício agudo promove um fenótipo inflamatório diferente entre os genótipos.

(A-C) Conteúdo muscular de citocinas. (D-F) Expressão gênica muscular de genes relacionados à inflamação. Os dados foram apresentados como média \pm erro-padrão. a = significativamente diferente do grupo Sedentário 2h dentro do genótipo. b = significativamente diferente do grupo Exercício 2h dentro do genótipo. c = significativamente diferente do grupo Sedentário 24h dentro do genótipo * = significativamente diferente entre genótipo no mesmo tempo. n = 6-8 camundongos por grupo. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

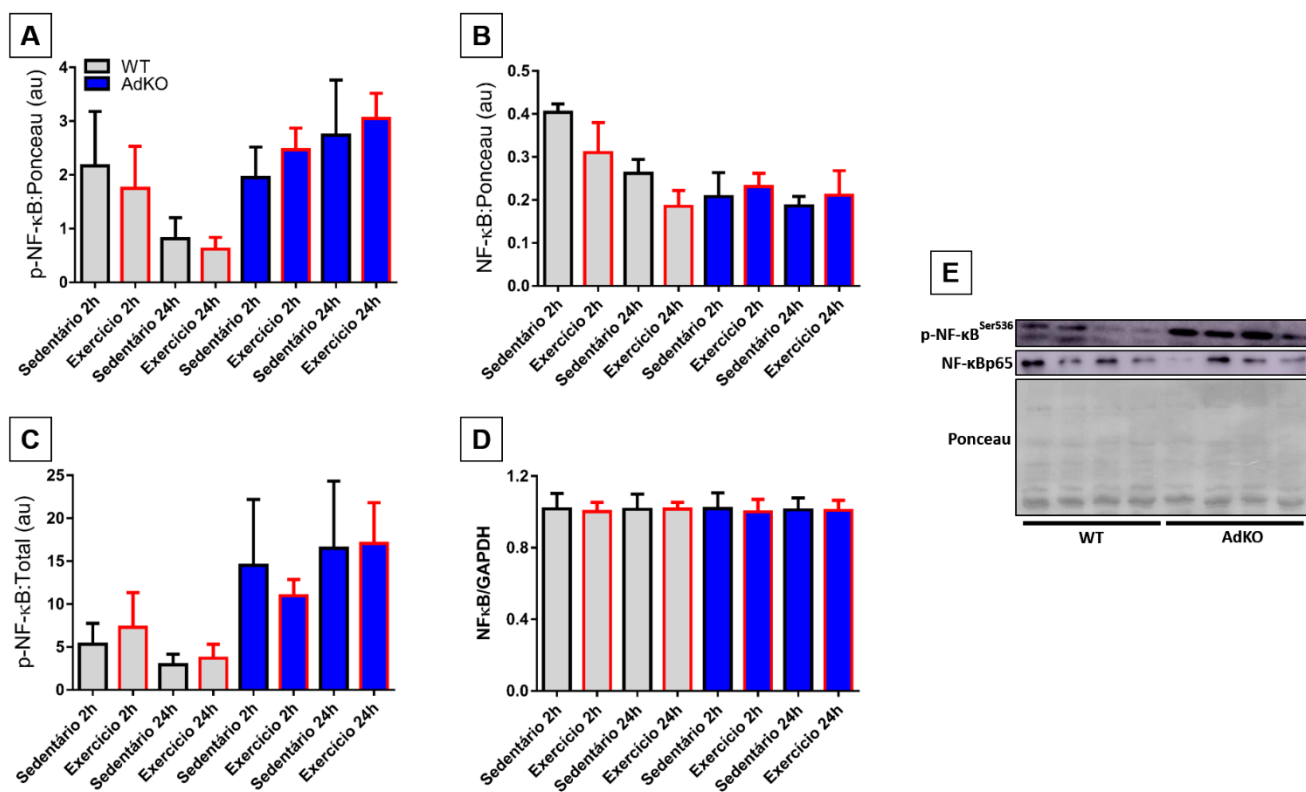


Figura 12. Animais AdKO apresentam diferente expressão proteica de NF-κB após o exercício agudo no músculo gastrocnêmio

(A-C) Expressão proteica de NF-κBp65 total e fosforilado (Ser⁵³⁶). (D) Expressão gênica de NF-κB. (E) Imagens representativas da análise de *western blot* no músculo gastrocnêmio. Os dados foram apresentados como média ± erro-padrão. n = 4-6 camundongos por grupo. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

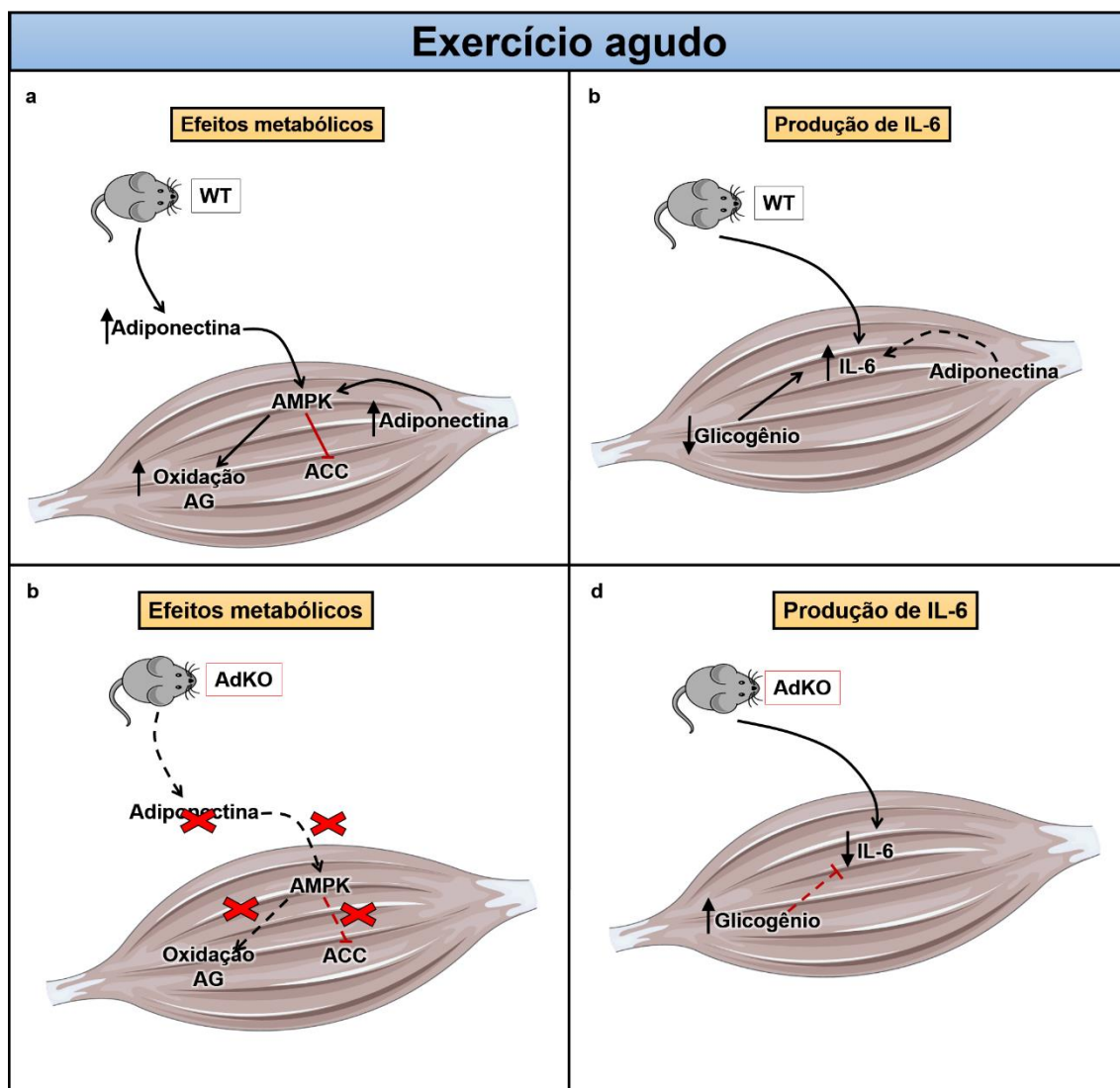


Figura 13. Diagrama esquemático dos efeitos do exercício físico na musculatura esquelética na presença ou ausência de adiponectina.

a) O exercício físico agudo aumenta a produção de adiponectina sérica e muscular esquelética, ativando AMPK e bloqueando ACC, dessa forma, melhorando a oxidação de ácidos graxos, **b)** perfil esse que foi desregulado na ausência de adiponectina. **c)** Os baixos níveis de glicogênio encontrados em camundongos WT, em comparação ao AdKO, estimularam a produção de IL-6 no contexto de exercício físico agudo, **d)** fenótipo que foi mitigado em camundongos AdKO devido ao elevado teor de glicogênio no músculo. Dessa forma, os animais AdKO apresentaram redução na oxidação de ácidos graxos e maior utilização de glicose. AMPK: Proteína quinase ativada por AMP; ACC: acetil-CoA carboxilase; WT: tipo selvagem (C57BL/6); AdKO: *knockout* para adiponectina. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

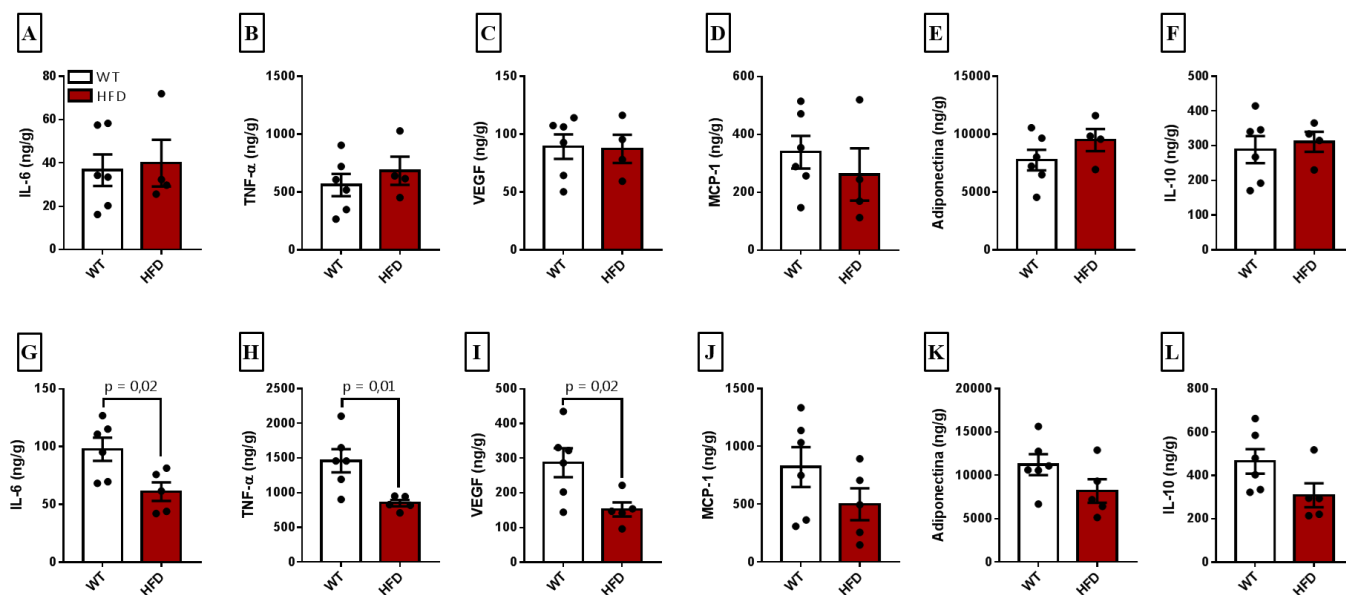


Figura 14. A dieta hiperlipídica não aumentou a produção de citocinas nos tecidos adiposos.

(A-F) concentração de citocinas no tecido adiposo subcutâneo. (G-L) concentração de citocinas no tecido adiposo retroperitoneal. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

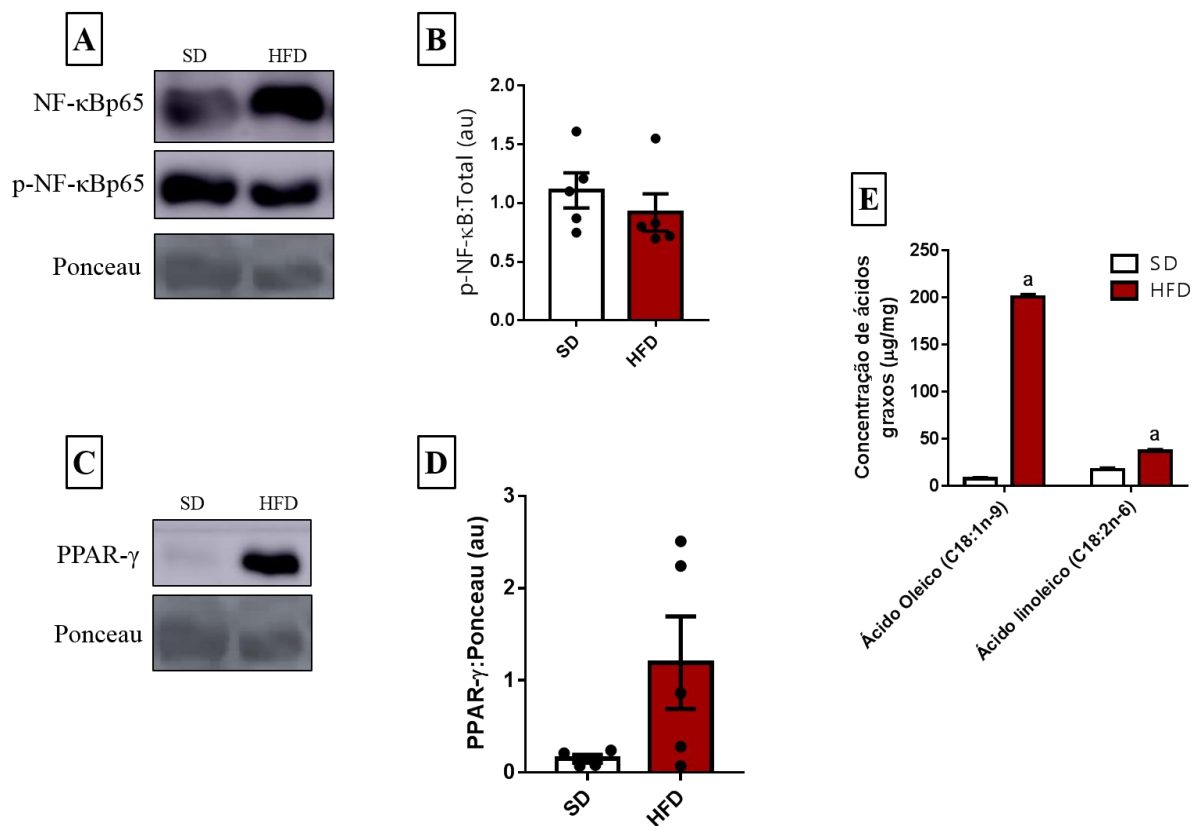


Figura 15. A dieta hiperlipídica não modulou a ativação de NF- κ B no tecido adiposo subcutâneo, mas regulou positivamente a expressão proteica de PPAR- γ .

(A) Imagens representativas da análise de *western blot* de NF- κ Bp65 total e fosforilado (Ser⁵³⁶). (B) Quantificação proteica de NF- κ Bp65 total e fosforilado (Ser⁵³⁶). (C) Imagem representativa da análise de *western blot* de PPAR- γ . (D) Quantificação proteica de PPAR- γ . (E) Composição de ácidos graxos na dieta hiperlipídica e padrão (DE SOUZA et al., 2020). [Clique aqui para voltar no texto.](#)

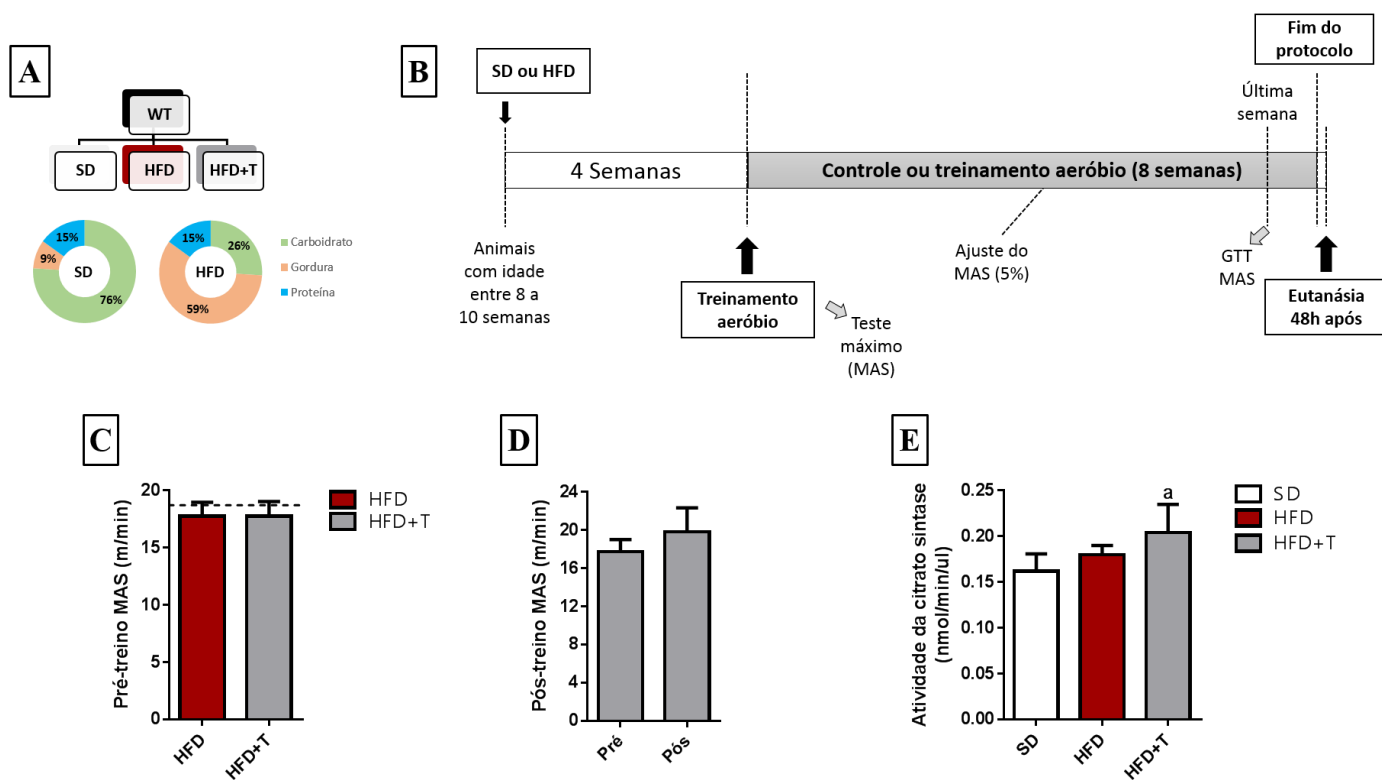


Figura 16. Desenho experimental e efeitos do treinamento aeróbio em parâmetros fisiológicos.

(A) Grupos experimentais e composição da dieta. (B) Desenho experimental ao longo de 12 semanas de intervenção. (C) Velocidade aeróbia máxima no início da intervenção. Linha tracejada: grupo SD. (D) Velocidade aeróbia máxima pós-intervenção no grupo exercitado. (E) Atividade da citrato sintase no músculo sóleo após intervenção. a = estatisticamente diferente de SD. MAS = velocidade aeróbica máxima; GTT = teste de tolerância à glicose. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

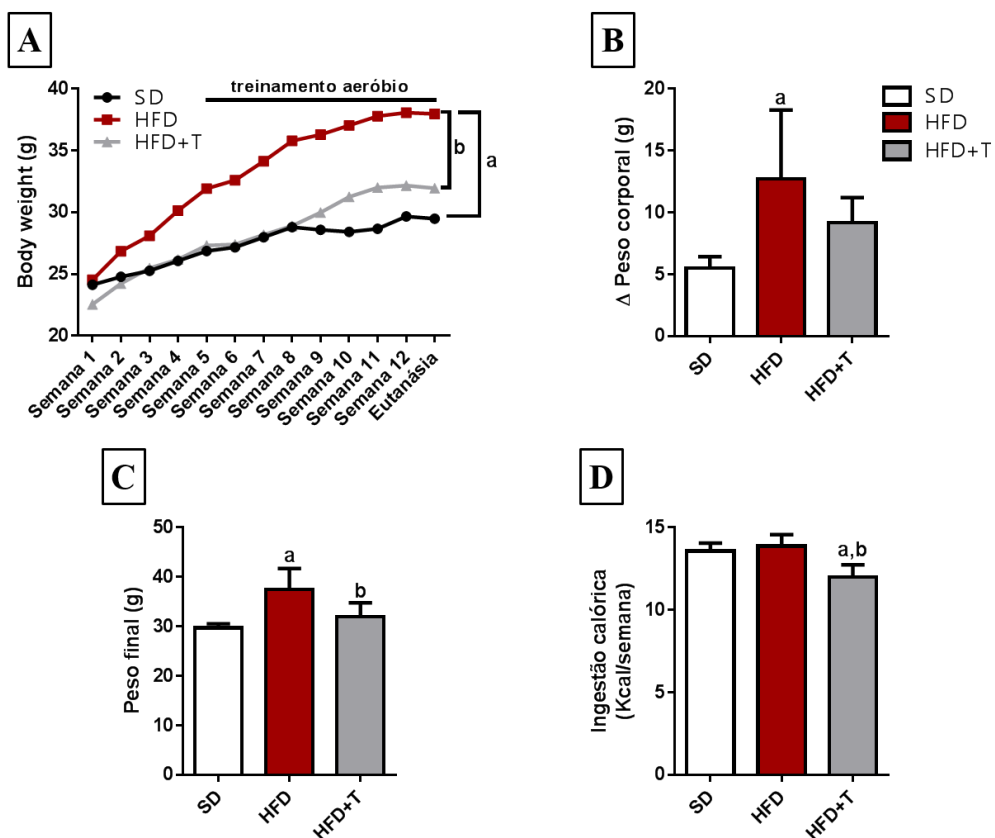


Figura 17. Treinamento aeróbio atenua o ganho de peso corporal.

(A) Peso corporal semanal. (B) Variação do peso corporal. (C) Peso corporal final. (D) ingestão calórica. a = estatisticamente diferente de SD. b = estatisticamente diferente de HFD. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

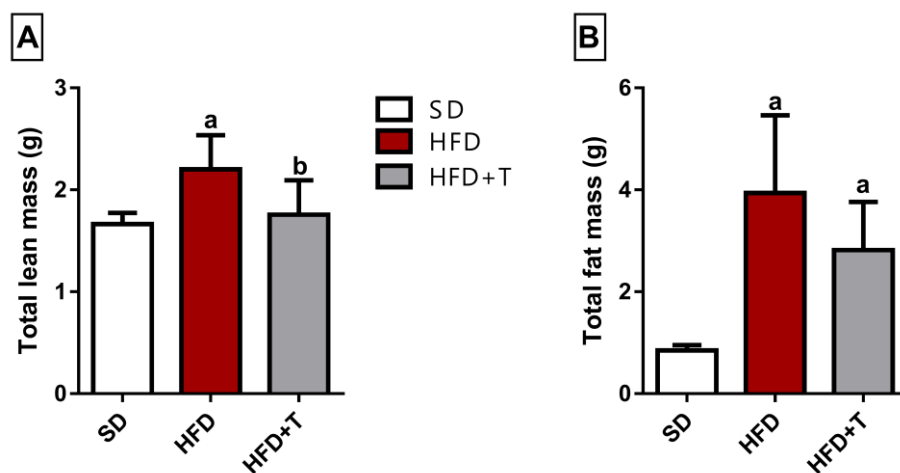


Figura 18. Diferenças entre a massa magra e gorda entre os grupos experimentais.

(A) A massa magra total foi calculada usando soma do fígado, e músculos gastrocnêmio, extensor longo dos dedos e sóleo. (B) A massa gorda total foi calculada usando a soma dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, subcutâneo e mesentérico. a = estatisticamente diferente de SD. b = estatisticamente diferente de HFD. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

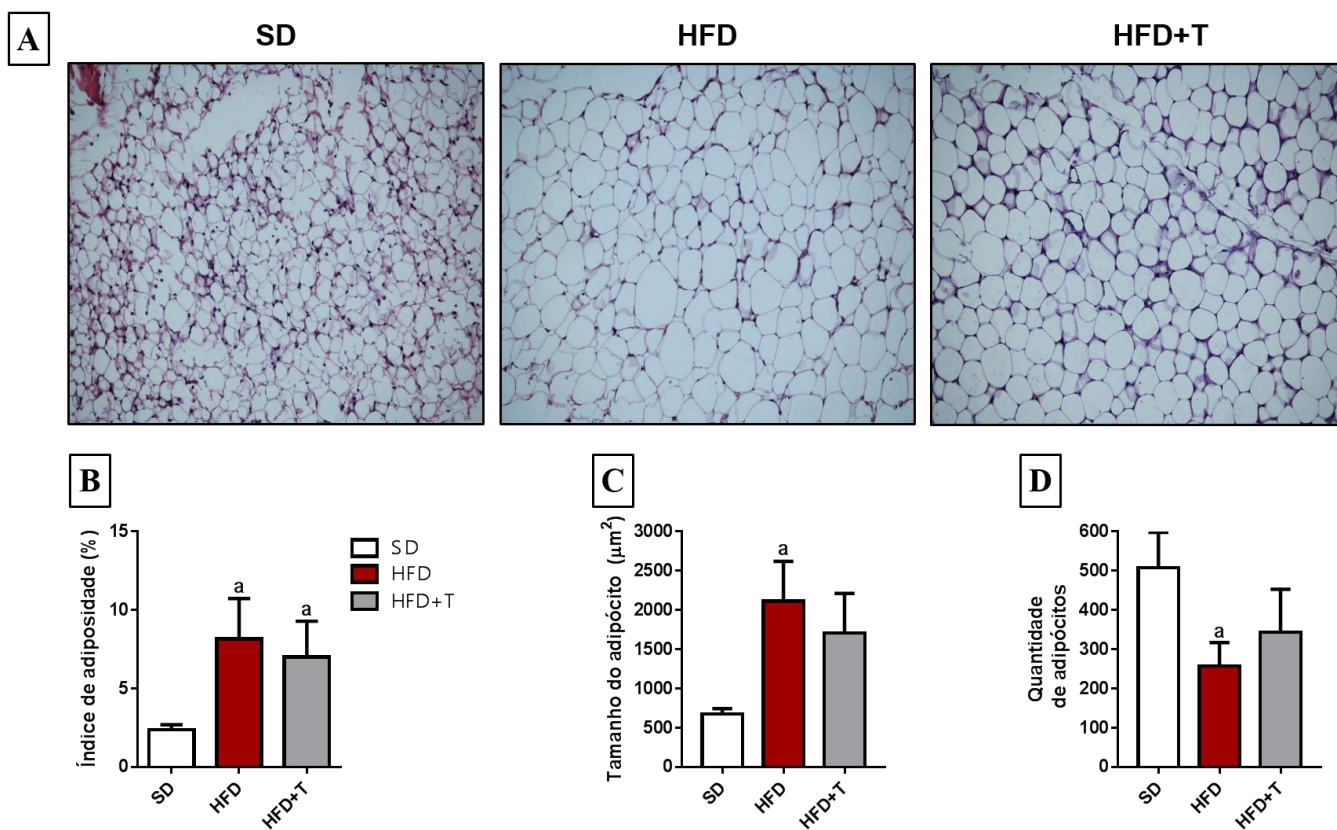


Figura 19. Treinamento aeróbio atenua a hipertrofia do adipócito, mas não o índice de adiposidade.

(A) Imagens representativas dos cortes histológicos do tecido adiposo subcutâneo corados com HE. (B) Índice de adiposidade. (C) Quantificação do tamanho dos adipócitos no tecido adiposo subcutâneo. (D) Quantificação da quantidade de adipócitos no tecido adiposo subcutâneo. a = estatisticamente diferente de SD. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

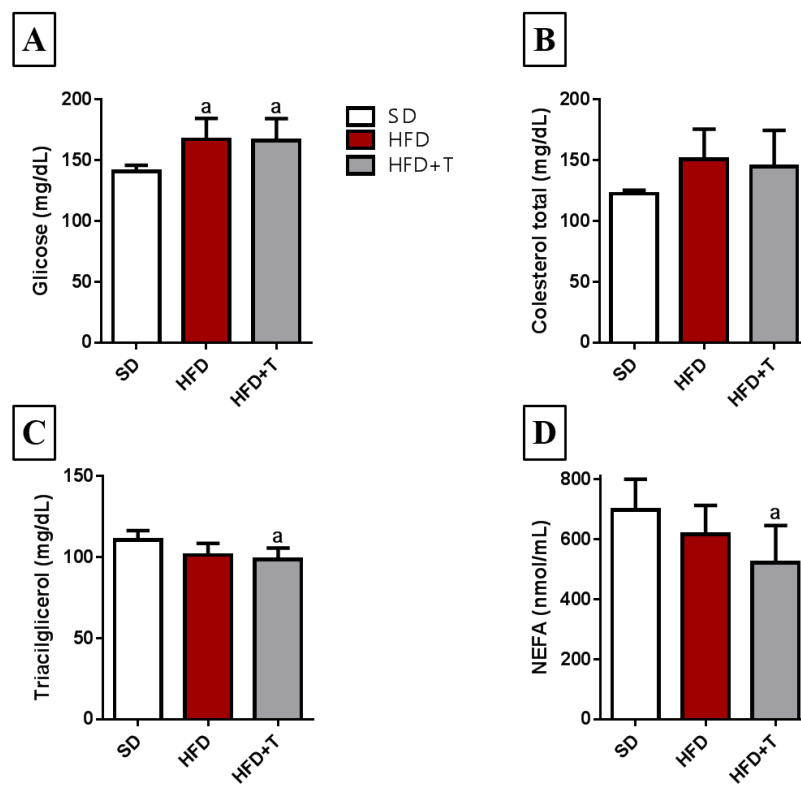


Figura 20. Treinamento aeróbio melhora o perfil lipídico. (A-D) Análise colorimétrica da concentração de metabólitos séricos. a = estatisticamente diferente de SD. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

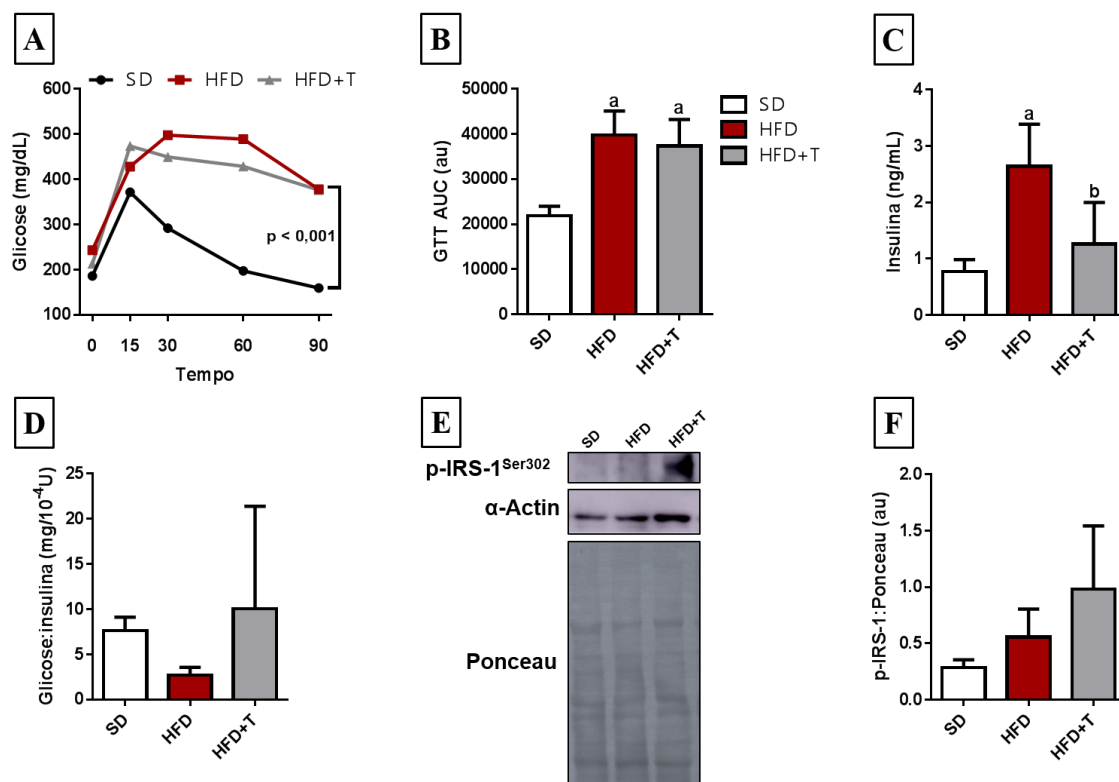


Figura 21. Treinamento aeróbio atenua a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica.

(A) Teste de tolerância à glicose. (B) Área sob a curva do GTT. (C) Concentração de insulina aos 30' de teste. (D) Razão glicose-insulina aos 30' de teste. (E) Imagem representativa da análise de *western blot* de p-IRS-1 (Ser³⁰²). (F) Quantificação proteica de p-IRS-1 (Ser³⁰²). a = estatisticamente diferente de SD. b = estatisticamente diferente de HFD. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

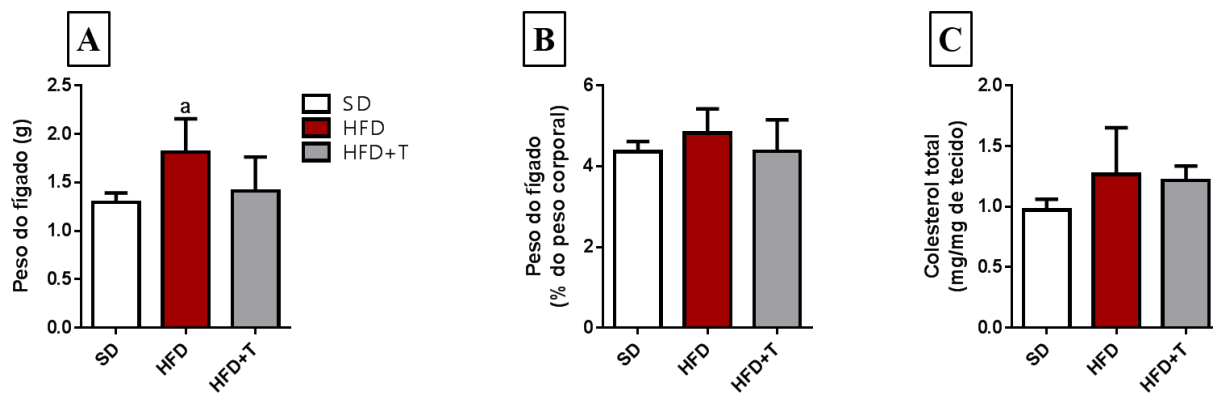


Figura 22. A dieta hiperlipídica aumenta o peso do fígado.

(A) Peso absoluto do fígado. (B) Peso relativo do fígado. (C) Concentração de colesterol hepático. a = estatisticamente diferente de SD. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

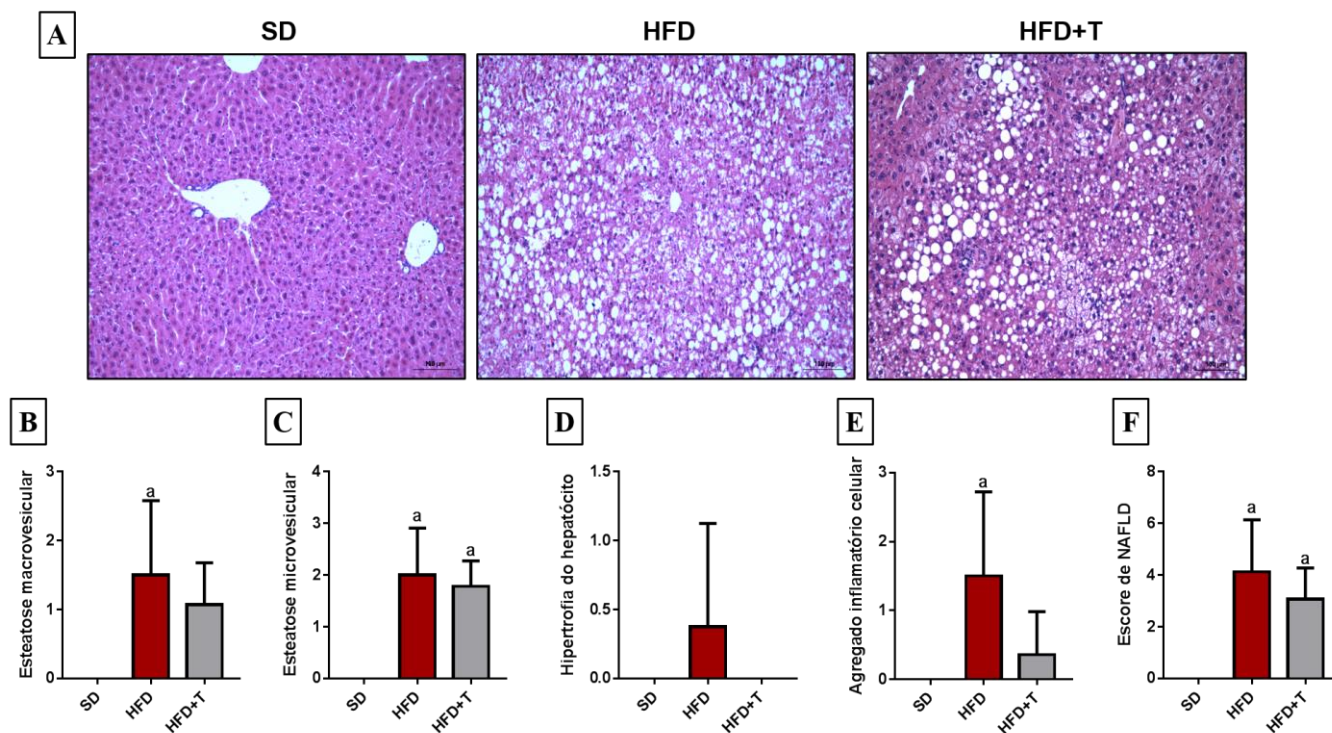


Figura 23. Treinamento aeróbio atenua a progressão da esteatose macrovesicular e inflamação hepática.

(A) Imagens representativas dos cortes histológicos do fígado corados com HE. Parâmetros utilizados para classificar NAFLD: Esteatose macrovesicular (B) e microvesicular (C), (D) Hipertrofia do hepatócito e (E) agregado inflamatório celular. (F) Escore de NAFLD. a = estatisticamente diferente de SD. No grupo SD todos os escores para NAFLD foram zero. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

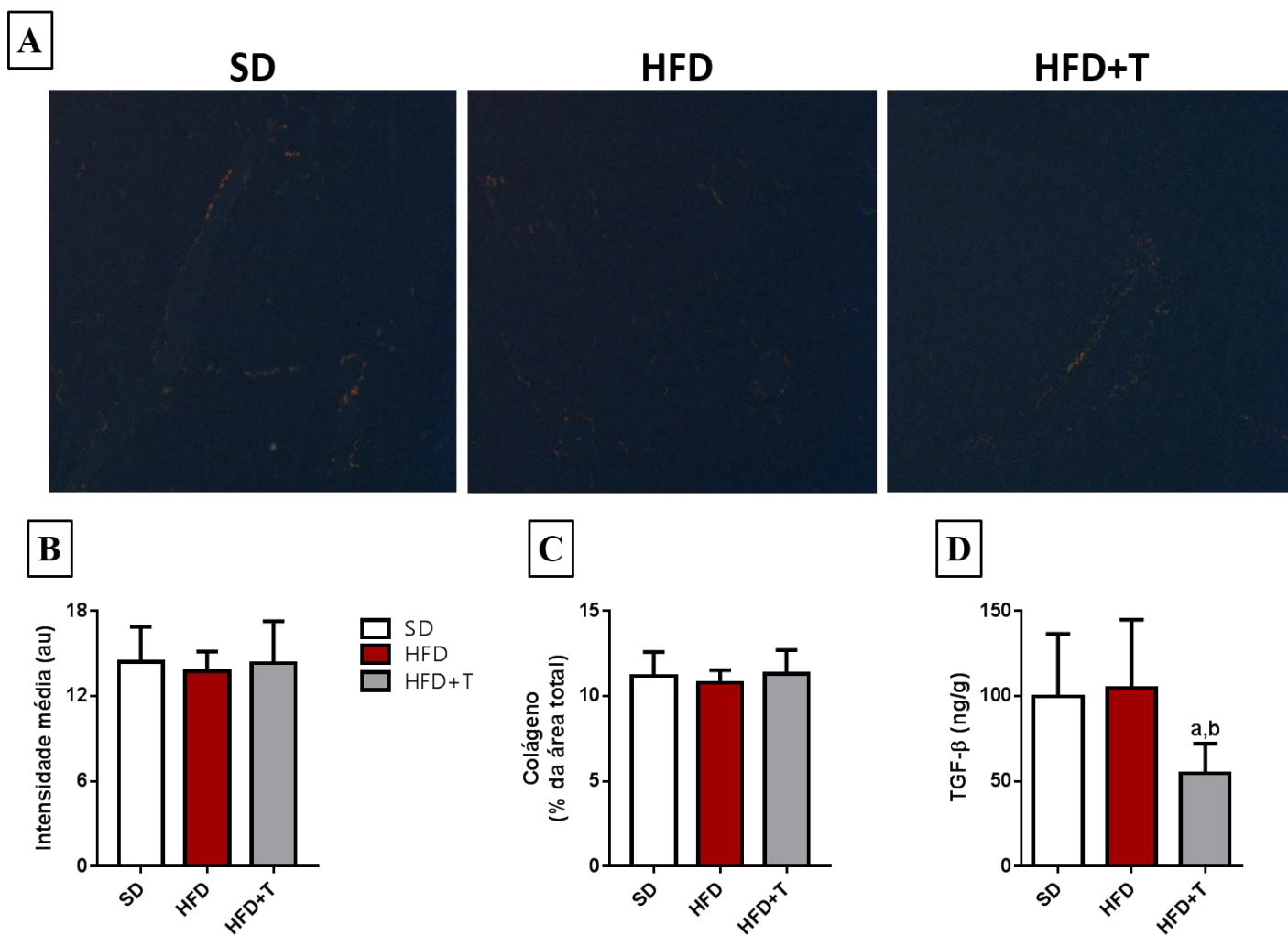


Figura 24. A dieta hiperlipídica não aumentou a quantidade de colágeno no fígado.

(A) Imagens representativas dos cortes histológicos do fígado corados com picrosirius. (B) Intensidade média de colágeno. (C) Porcentagem de colágeno por área total quantificada. (D) Concentração de TGF- β no fígado. a = estatisticamente diferente de SD. b = estatisticamente diferente de HFD. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

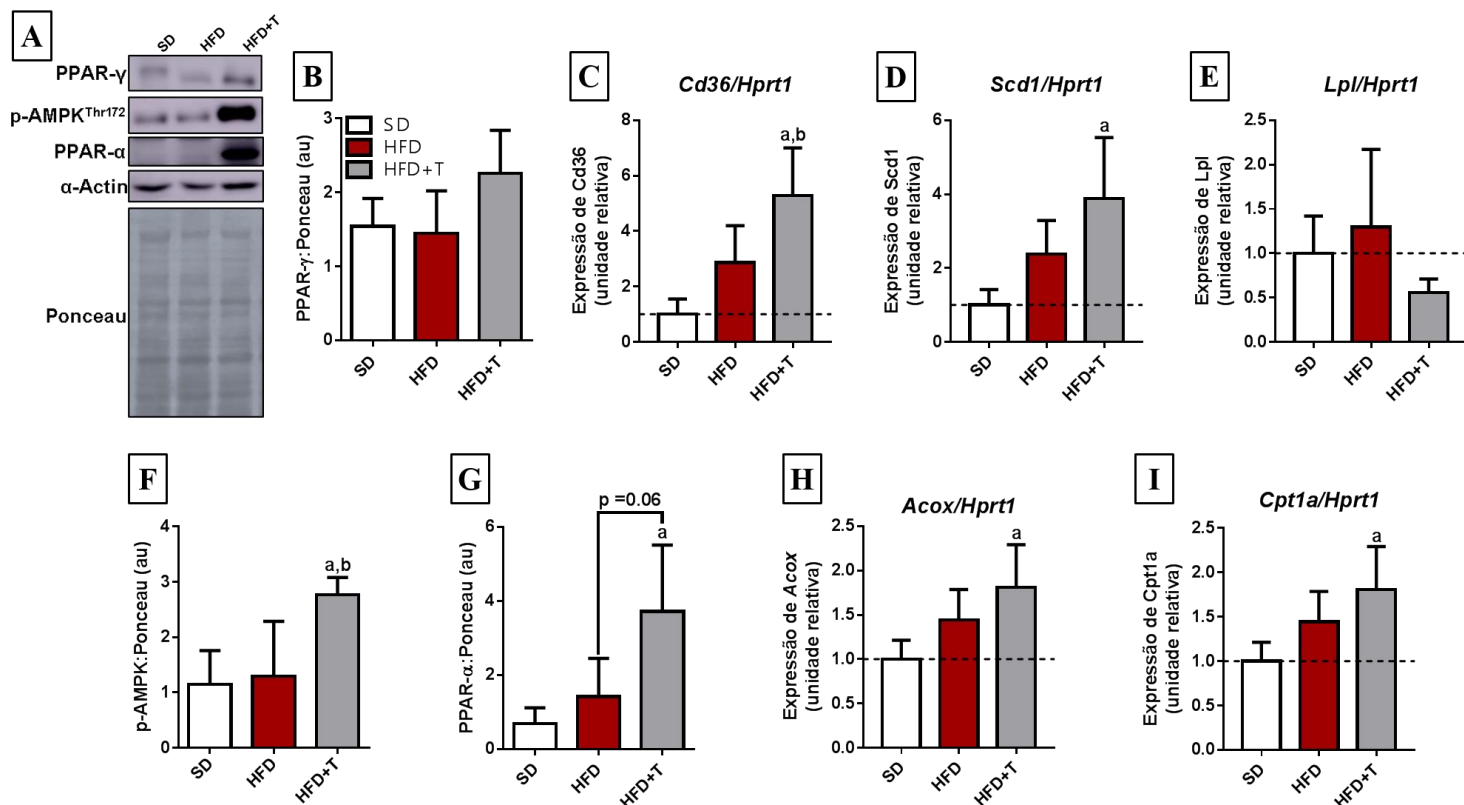


Figura 25. O treinamento aeróbico ativa a sinalização AMPK-PPAR- α e PPAR- γ hepática.

(A) Imagens representativas da análise de *western blot* do fígado. (B) Expressão proteica de PPAR- γ . (C – E) Expressão relativa de genes alvo do PPAR- γ . (F) Expressão de AMPK α fosforilada (Thr172). (G) Expressão proteica de PPAR- α . (H – I) Expressão relativa de genes alvo do PPAR- α . a = estatisticamente diferente de SD. a = estatisticamente diferente de SD. b = estatisticamente diferente de HFD. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

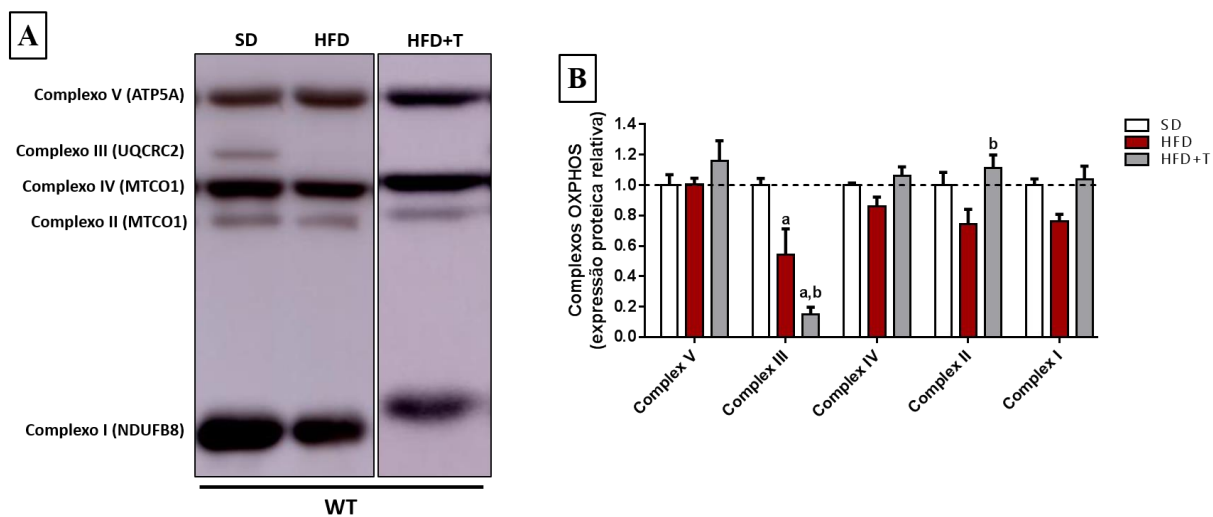


Figura 26. Efeito da dieta hiperlipídica e treinamento aeróbico na expressão proteica dos complexos mitocondriais.

(A) Imagens representativas da análise de *western blot* dos complexos mitocondriais hepáticos.

(B) Quantificação proteica dos complexos mitocondriais. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

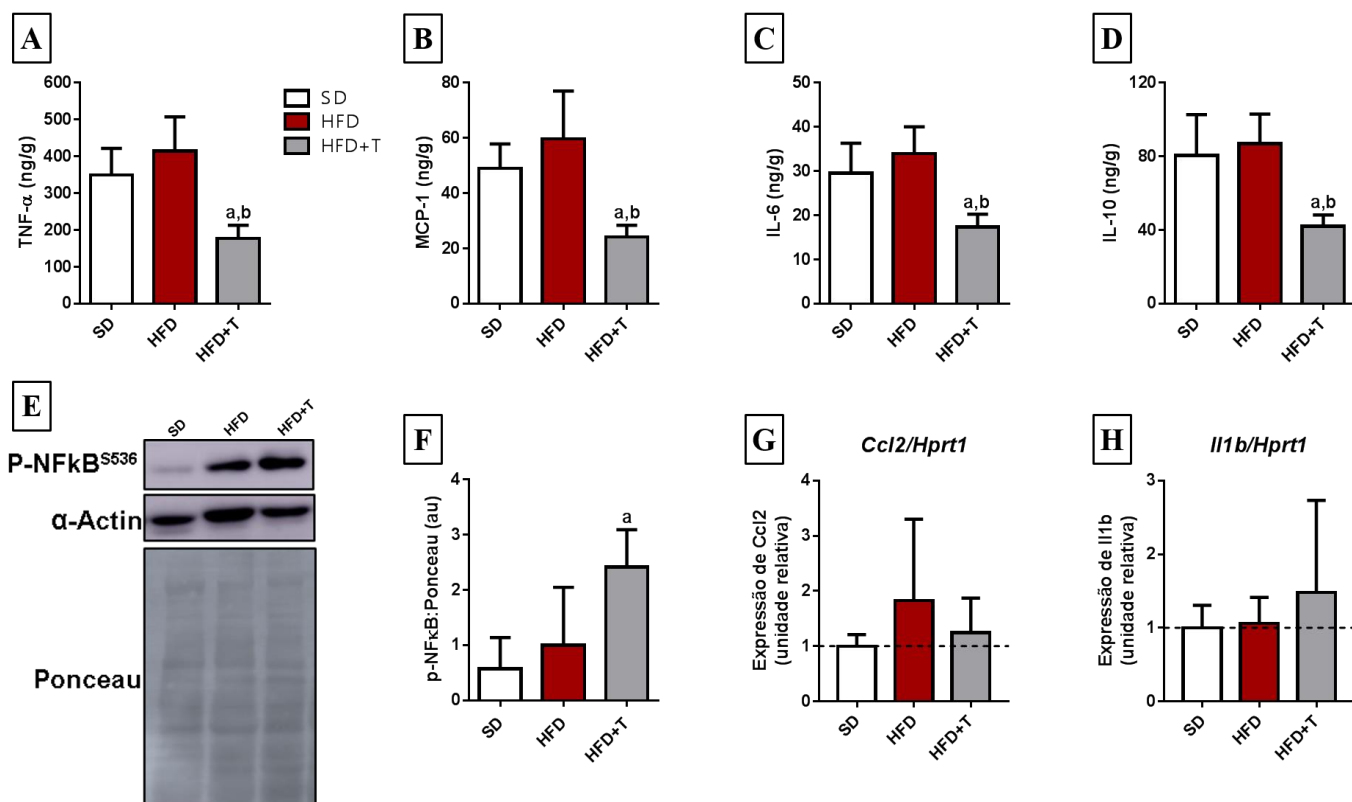


Figura 27. O treinamento aeróbico alivia a inflamação do fígado, independentemente da expressão de NF-κB.

(A-D) Expressão de citocinas hepáticas. (E) Imagens representativas da análise de *western blot* de p-NF-κB (Ser⁵³⁶). (F) Quantificação da expressão proteica de p-NF-κB (Ser⁵³⁶). (G-H) Expressão relativa de genes alvo de NF-κB. a = estatisticamente diferente de SD. b = estatisticamente diferente de HFD. [Clique aqui para voltar no texto.](#)

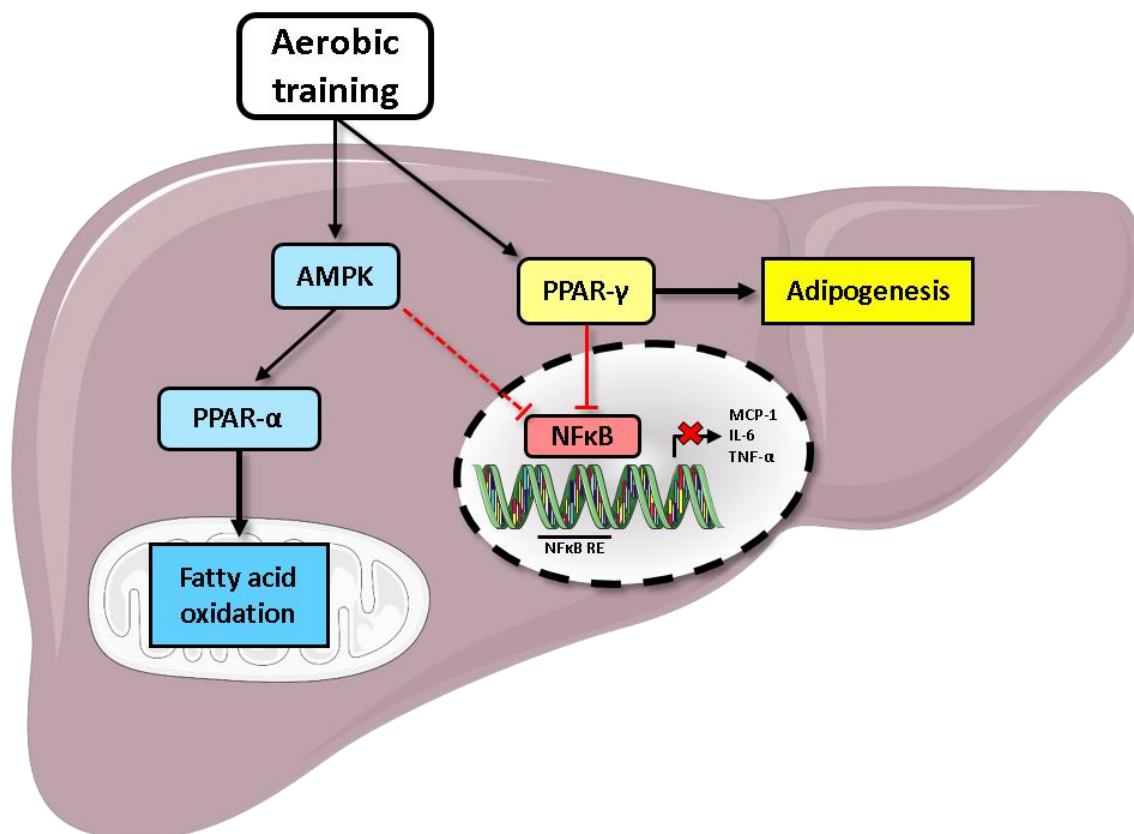


Figura 28. O treinamento aeróbico atenua os marcadores da NAFLD por meio da sinalização AMPK-PPAR- α e da ativação do PPAR- γ .

O treinamento aeróbico pode atenuar a esteatose macrovesicular e a inflamação através da sinalização AMPK-PPAR- α , promovendo assim a oxidação dos ácidos graxos. A combinação de HFD e treinamento físico também regula positivamente a atividade do PPAR- γ , melhorando a inflamação do fígado, mas também sustenta a esteatose hepática por meio da adipogênese. A linha tracejada indica uma hipótese e as linhas sólidas indicam caminhos já estabelecidos. As linhas vermelhas indicam a inibição da via inflamatória. [Clique aqui para voltar no texto.](#)