UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ALEXANDRE ROVERATTI SPAGNOL

Efeitos do exercício físico sobre o metabolismo oxidativo hepático e muscular em camundongos obesos e nocautes para adiponectina

São Paulo
2021

ALEXANDRE ROVERATTI SPAGNOL

Efeitos do exercício físico sobre o metabolismo oxidativo hepático e muscular em camundongos obesos e nocautes para adiponectina

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues

Versão original.

São Paulo

2021

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

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)

SPAGNOL , ALEXANDRE ROVERATTI
Efeitos do exercício físico sobre o metabolismo oxidativo hepático e muscular em camundongos obesos e nocautes para adiponectina / ALEXANDRE ROVERATTI SPAGNOL ; orientadora ALICE CRISTINA RODRIGUES. -- São Paulo, 2021.
64 p.

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

1. Exercício Físico. 2. Metabolismo Oxidativo. 3. Adiponectina. I. CRISTINA RODRIGUES, ALICE , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alexandre Roveratti Spagnol

Título da Tese: **Efeitos do exercício físico sobre o metabolismo oxidativo hepático e muscular em camundongos obesos e nocautes para adiponectina**

Orientadora: Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues

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

( ) Aprovado ( ) Reprovado

Examinador(a): **Assinatura .....**
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): **Assinatura .....**
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): **Assinatura .....**
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: **Assinatura .....**
Nome: .....
Instituição: .....

ICBUSP

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 "***microRNAs envolvidos na via de sinalização da adiponectina: Modulação através do exercício físico no músculo esquelético de camundongos C57Bl/6 obesos.***", registrado sob o protocolo nº ***21/2016***, 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 ***15/03/2016*** 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 tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.)** ***Alice Cristina Rodrigues***
- Departamento: *Farmacologia*
- Membros da Equipe: *Mariana Mendonça (Iniciação científica), Alexandre Roveratti Spagnol (Pós-graduando)*

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 "***microRNAs associated with adiponectin signaling pathway: Modulation by physical exercise in skeletal muscle of C57BL/6 obese mice.***", protocol nº ***21/2016***, 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 ***3/15/2016*** 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 **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.)** ***Alice Cristina Rodrigues***
- Team members: *Mariana Mendonça (Undergraduate Student), Alexandre Roveratti Spagnol (Graduate Student)*

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
Mus musculus	*C57bl/6*	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*80*
	Adiponectina KO-B6;129-dipoqtm1Chan/J	*Macho/Male*	*8 semanas/weeks*	*80*

São Paulo, 18 de março de 2016.

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

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Secretário CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus queridos e amados pais Alcides e Marcia, os quais me inspiraram e ainda me inspiram, pois sempre proporcionaram todo apoio e amparo familiar para um desenvolvimento físico e intelectualmente saudável e consequente realização desta trajetória acadêmica.

Aos meus irmãos André e Isabela por todo amor e carinho, espelhos para minhas condutas e desenvolvimento.

À Professora Alice por ter me dado a oportunidade de conhecer um mundo novo. Obrigado por toda compreensão, aprendizado, instrução, puxões de orelha, agilidade, prontidão em ajudar durante todos esses anos no laboratório que contribuíram para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À Lais Soares Vello, a qual esteve comigo durante quase todo meu processo acadêmico, a pessoa mais doce que pude compartilhar minha vida, sem a qual não poderia ter concluído esta etapa.

Às meninas do laboratório, Ailminha, Anaysa, Bia, Bruna, Erica, Ká, Mari, parte de vocês estiveram comigo desde o estágio inicial no laboratório, pré ingresso no doutorado e inúmeros outros momentos, confraternizações, farmacoffees, disciplinas, apresentações e sempre me ajudaram vigorosamente em diversas ocasiões sem hesitar dentro e fora do laboratório, sou imensamente grato a vocês.

À todas as ICs que passaram pelo laboratório e as quais eu tive a oportunidade de ensinar e aprender algo novo, em especial Nayara, Karina e Gabi.

Aos amigos que o ICB me deu, Guga, Will, João Alfredo, Hugo e Jean, em especial Chico, Lucas, Adilson e Magal que estavam comigo nos momentos mais difíceis. Obrigado por me fazerem rir quando eu achava que tudo estava perdido, por todo o conselho, ajuda, paciência, amizade e toda força de vontade para repetir, repetir e repetir, eu disse repetir

experimentos? Verdadeiros “cavalheiros”, que me cederam inúmeras vezes caronas, dormitório, comida, cerveja e roupa lavada. Sou eternamente grato.

Aos meus velhos amigos de infância que me acompanham até hoje, Cezinha, Fassis, Nibal em especial Du, Leo e Luiz os quais puderam presenciar os bastidores da minha vida acadêmica e me direcionar para um caminho de sobriedade em meio a tantas turbulências e ruídos e tornar mais clara e leve minha visão sobre o mundo que me cerca.

Aos Professores, Agostinho, Anselmo, Britto, Camarini, Carol Munhoz, Donato, Eliana, Emer, Festuccia, Letícia, Lúcia, Rui, Soraia, Torrão, Ubira, Zeca, e aos alunos destes laboratórios, quais tive a oportunidade de conhecer e que gentilmente concederam suas bancadas, aparelhos, reagentes, vidrarias, anticorpos, freezer, protocolos, para a realização de inúmeros experimentos não somente meus, como também de meus colegas.

Às técnicas de laboratório, Aninha e Rosângela, a quais sempre estavam dispostas a me ajudar com um sorriso no rosto e muita disposição para ensinar.

Ao técnico de biotério Brás, um companheiro para toda hora, talvez a pessoa mais gentil e humilde que conheci em todo ICB, por fazer muito mais que seu trabalho lhe requisitava, sua ajuda e companhia foram mais que essenciais à minha pessoa e a este trabalho, meu muito obrigado.

Às secretárias Mônica e Camila por toda paciência, agilidade, eficácia e compreensão.

Aos funcionários do “bandejão” da USP. Para além da economia em que me gerou esses anos de bandejão para ser possível realizar esta etapa de minha vida, foi realmente terapêutico poder almoçar e jantar em paz e ser tão bem recebido todas as vezes.

Ao professor John Joseph McCarthy o qual prontamente e carinhosamente atendeu a meu pedido de doutorado sanduíche em seu laboratório na Universidade de Kentucky e me proporcionou uma enorme bagagem científica de resoluções de problemas, ensinamentos, sua luta e vencimento de um câncer, uma visão de mundo pela qual hoje carrego uma enorme admiração - *“work hard, play hard”*.

Por último e não menos importante, agradeço todo apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número do processo (166599/2017-4).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Cada um de nós é, sob a perspectiva cósmica, precioso. Se um ser humano discorda de você, deixe-o viver. Em cem bilhões de galáxias, você não encontrará outro.”

Carl Sagan

RESUMO

ROVERATTI, AS. Efeitos do exercício físico sobre o metabolismo oxidativo hepático e muscular em camundongos obesos e nocautes para adiponectina. 2021. p. 64 Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Historicamente, o organismo dos seres humanos foi adaptado à escassez alimentar e a uma alta exigência energética através da atividade física, fatores estes que moldaram nosso metabolismo. Nos dias atuais, estes mesmos organismos pairam sobre um ambiente controverso, onde a alta disponibilidade calórica e a inatividade física promovem um ecossistema obesogênico. Hoje, obesidade é um problema de saúde pública mundial. O tecido adiposo tem como principal adipocina secretada, a Adiponectina, um importante hormônio que atua beneficamente no metabolismo dos tecidos muscular e hepático, principalmente se modulada pelo exercício físico. O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do exercício físico na via da adiponectina nos tecidos muscular e hepático em animais induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica. Foram utilizados camundongos *C56Bl6* machos divididos incialmente em 2 grupos: *Wild Type* (*WT*) e *Knockout* para adiponectina (*adipoKO*). Os animais *WT* validaram o aumento da adiponectina sérica promovida pelo protocolo de exercício físico (EF). Após esta etapa o foco do estudo se concentrou sobre os animais *adipoKO*, onde foram divididos em 3 grupos: C: controle, H: animais que receberam a dieta hiperlipídica e HT: animais que receberam a dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento em esteira rolante durante 8 semanas. Como resultados iniciais obtivemos a redução do peso corporal, a melhora do K_{ITT}, porém não houve melhora na sensibilidade glicêmica. Portanto, foi avaliado no tecido hepático genes (RNAm) da via glicogenólise e gliconeogênese, os quais não foram alterados pelo EF demonstrando possível dependência à adiponectina. Foi determinado histologicamente o quadro de esteatose hepática induzida pela dieta, porém o EF não foi capaz de restaurar gotas lipídicas micro e macrovesiculares à nível do grupo Controle. A partir disto, genes relacionados à via da adiponectina foram avaliados para entender a participação do EF neste tecido. O PPARγ, corrobora fortemente com a literatura como ativador da oxidação lipídica hepática, demonstrou alta expressão não dependente de adiponectina nos animais obesos sendo restaurado à níveis controle pelo exercício, em parte explicado também pela superexpressão de Acsl3 pela dieta hiperlipídica. Histologicamente, constatamos que o EF não induz hipertrofia nas miofibras e não reduz acúmulo de lipídeos no músculo esquelético em animais *AdipoKO*, embora o PGC-1α seja superexpresso pelo exercício físico no músculo esquelético mesmo não

encontrada diferenças na expressão de receptores AdipoR1. Por fim, nossos resultados, postulam que, neste modelo, tão importante quanto a restauração da sensibilidade à insulina para uma melhora sistêmica do organismo, é a presença da adiponectina para o metabolismo da glicose e embora ocorra a redução o peso corporal, o protocolo de exercício físico aeróbio não sustentou efeitos significativos glicolíticos no fígado, na redução de lipídeos nos tecidos hepático e muscular na ausência de adiponectina.

Palavras-chave: Exercício Físico, Obesidade, Metabolismo Oxidativo, Adiponectina.

ABSTRACT

ROVERATTI, A.S. Effects of physical exercise on hepatic and muscle oxidative metabolism in adiponectin knockout obese mice. 2021. p. 64 Ph. D. these (Department of Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Historically, human beings' bodies were adapted to food shortages and a high energy requirement through physical activity, factors that shaped our metabolism. Nowadays, these same organisms hover over a controversial environment, where high caloric availability and physical inactivity promote an obesogenic ecosystem. Today, obesity is a global public health issue. Adipose tissue has as its main secreted adipokine, Adiponectin, an important hormone that acts beneficially in the metabolism of muscle and liver tissue, especially if modulated by physical exercise. This study aims to evaluate the effects of physical exercise on the adiponectin pathway in muscle and liver tissue in animals induced to obesity by a high-fat diet. Male *C56Bl6* mice were initially divided into 2 groups: *Wild Type* (*WT*) and *Knockout* for adiponectin (*adipoKO*). The *WT* animals validated the increase in serum adiponectin promoted by the physical exercise protocol (PE). After this step, the focus of the study was concentrated on the adipoKO animals, which were divided into 3 groups: C: control, H: animals that received the high-fat diet and HT: animals that received the high-fat diet and underwent training on a treadmill during 8 weeks. As initial results, we obtained a reduction in body weight, an improvement in KITT, but there was no improvement in glycemic sensitivity. Therefore, genes (mRNA) of the glycogenolysis and gluconeogenesis pathway were evaluated in liver tissue, which were not altered by EF, demonstrating a possible dependence on adiponectin. Highfat diet-induced hepatic steatosis was histologically determined, but the EF was not able to restore micro and macrovesicular lipid drops at the level of the Control group. From this, genes related to the adiponectin pathway were evaluated to understand the participation of EF in this tissue. PPARγ, strongly corroborates the literature as an activator of hepatic lipid oxidation, showed high non-dependent expression of adiponectin in obese animals, being restored to control levels by exercise, in part also explained by the overexpression of Acsl3 by the high-fat diet. Histologically, we found that EF does not induce myofiber hypertrophy and does not reduce lipid accumulation in skeletal muscle in AdipoKO animals, although PGC-1α is overexpressed by physical exercise in skeletal muscle even though no differences were found in the expression of AdipoR1 receptors. Finally, our results postulate that, in this model, as important as the restoration of insulin sensitivity for a systemic improvement of the body is the presence of

adiponectin for glucose metabolism and, although there is a reduction in body weight, the protocol of aerobic physical exercise did not support significant liver glycolytic effects and lipid reduction in liver and muscle tissue in the absence of adiponectin.

Keywords: Physical Exercise, Obesity, Oxidative Metabolism, Adiponectin.

LISTA DE ABREVIATURAS

Acaad11	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11
Acsl3	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
AdipoR1	Adiponectin Receptor 1
AdipoR2	Adiponectin Receptor 2
AdipoKO	Adiponetcin Knockout
AMPK	Adenosine monophosphate(AMP)-activated protein kinase
APPL1	Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1
AU	Arbitrary Unit
AUC	Area Under the Curve
Cpta1A/B	Carnitine palmitoyltransferase
FGF21	Fibroblast growth factor 21
Glut	Glucose Transporter
G6pc	Glucose-6-phosphatase catalytic subunit
HDL	High density lipoprotein
Hprt1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IGF-1	Insulin growth factor
IL-6	Interleukin-6
LDL	Low density lipoprotein
LKB1	Liver Kinase B1 / Serine/Threonine Kinase 11 (STK11)
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
NAFDL	Non-alcoholic fat liver disease
Pepck	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
Pparα	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
Pparγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Sirt1	Sirtuin 1
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
UCP3	Mitochondrial uncoupling protein
VLDL	Very low density lipoprotein

Sumário

INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO DE LITERATURA 17
2.1 Sedentarismo e Obesidade: Histórico 17
2.2 Epidemiologia e Fisiopatologia da Obesidade 19
2.3 Integração metabólica promovida pelo tecido hepático 22
2.4 Exercício Físico como Intervenção Terapêutica 23
2 OBJETIVO 26
3 MATERIAL E MÉTODOS 26
3.1 Animais 26
3.2 Aspectos Éticos 27
3.3 Genotipagem dos animais adipoKO e seus irmãos selvagens 27
3.4 Desenho Experimental 28
3.5 Protocolo de Treinamento Físico e Teste de tolerância ao esforço (Tmáx) 29
3.6 Pesagens e Análise de Composição corporal 30
3.7 Teste de tolerância à glicose (ipTTG) 30
3.8 Teste de tolerância à insulina (ipTTI) 30
3.9 Teste de tolerância a piruvato (ipTTP) 30
3.10 Parâmetros Plasmáticos 31
3.11 Análises Histológicas 31
3.11.1 Hematoxilina e Eosina 32
3.11.2 Sudan Black 32
3.12 Quantificação da expressão de RNAm por PCR em tempo real 32
3.13 Quantificação da expressão das proteínas alvo por Western Blotting 33
3.14 Análise Estatística 34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
4.1 Efeito do treinamento aeróbio na concentração de adiponectina plasmática 35
4.2 Efeito do treinamento aeróbio nos parâmetros metabólicos de animais AdipoKO 37
4.3. O exercício físico não diminui o acúmulo de lipídio hepático em animais adipoKO obesos 43
4.4 O exercício físico não induz hipertrofia no músculo esquelético de animais adipoKO obesos 50
4.4 O exercício físico não reduz acúmulo de lipídeos no músculo esquelético de animais adipoKO obesos 52
5 CONCLUSÃO 54

INTRODUÇÃO

Historicamente os *Homo Sapiens* e seus ancestrais desenvolveram mecanismos celulares extremamente eficientes para o armazenamento de energia (Eknoyan, 2006).

Nos dias atuais, este refinado mecanismo de armazenamento energético é confrontado não mais com escassez de alimento, porém com muita oferta calórica. Cenário ideal para o desenvolvimento da patologia conhecida como obesidade.

Paralelamente a este rebuscado resquício evolutivo de armazenamento de energia, a capacidade de correr do gênero *Homo* promovida pela ascensão do bipedalismo há cerca de 2 milhões de anos atrás moldou nossa atual estrutura músculo esquelética e consequentemente nossa capacidade gastar energia, ou seja, nosso metabolismo (Bramble; Lerberman, 2004).

Desse modo, os únicos primatas sobreviventes do gênero *Homo*, nós, os *Sapiens*, possuímos um organismo forjado e herdado há de centenas de milhares de anos atrás o qual apresenta um eficaz e primitivo metabolismo energético que atualmente se encontra refém de um ambiente totalmente modificado pelo sedentarismo e pela alta oferta de calorias.

Quanto maior o consumo calórico de um indivíduo em relação ao seu gasto, maior será o acúmulo de tecido adiposo em seu organismo. Em última análise, isso significa maior depósito de gorduras viscerais e subcutâneas. Tal acúmulo excessivo destes depósitos caracteriza a Obesidade, uma doença que atua de maneira crônica e acomete milhões de pessoas no mundo todo e aumenta significativamente o risco de outras inúmeras doenças (Eknoyan, 2006).

O tecido adiposo é conhecido como um grande órgão endócrino (Galic, 2010), o qual secreta substâncias que atuam diretamente no metabolismo, como por exemplos as chamadas adipocinas.

Adipocinas são peptídeos que sinalizam o status funcional do tecido adiposo, as quais têm como alvo vários tecidos como cérebro, fígado, pâncreas, músculo e até mesmo o sistema imune (Fasshauer; Blüher, 2015).

Uma dessas importantes adipocinas secretadas pelo tecido adiposo é a Adiponectina, um hormônio que também pode ser derivado do músculo esquelético, em menor escala, e que regula homeostase energética e sensibilidade à insulina (Galic, 2010).

Em harmonia com o metabolismo adiposo, um outro tecido importante para toda a rede metabólica demonstrada neste trabalho é o tecido hepático, o qual interage diretamente com o acúmulo de gordura e efeitos do exercício físico.

Frente a estes efeitos colaterais do excesso de calorias, o tecido muscular, é um potente opositor. O músculo esquelético é um dos maiores tecidos do corpo humano, chega a equivaler a 40% do peso total do corpo de um indivíduo adulto e representa a maior parcela do gasto calórico no organismo (Frontera; Ochala, 2015).

Portanto, o presente trabalho visa avaliar a atuação do exercício físico e a via da adiponectina na melhora no quadro da obesidade, esteatose hepática e resistência à insulina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sedentarismo e Obesidade: Histórico

A empreitada evolutiva dos seres Humanos e seus ancestrais é composta por uma sequência de eventos os quais adequaram o rumo metabólico de nosso organismo e consequentemente do processo saúde-doença.

Entre mutações no metabolismo do ácido úrico dos antigos primatas até estabilizações climáticas há 12 milhões de anos atrás, Andrews e Johnson (2020), destacam que entender o ambiente dietético o qual os Humanos foram expostos no passado remoto podem nos levar a compreender melhor as doenças atuais.

Por volta de 2 milhões de anos atrás o bipedalismo conquista um papel central no organismo de hominídeos chamados *Homo Erectus* e aspectos morfofuncionais importantes para a estabilização desta postura encontram-se consistentes como por exemplo adaptações nos ossos dos quadris e dos pés, aumento do comprimento das pernas e ajustes na cintura escapular (Andrews; Johnson, 2020).

Dentre vantagens e desvantagens evolutivas do bipedalismo, tal postura permitiu aos primeiros hominídeos, duas condições importantes a serem destacadas: um meio de locomoção em que pudessem percorrer longas distâncias (Bramble; Lieberman, 2004; Napier JR, 1964) e braços livres com mãos e dedos habilidosos para manufaturar ferramentas, caçar, controlar o fogo e se alimentar com mais competência consumindo fontes de caloria animal (Andrews; Johnson, 2020).

O cozimento de alimentos e o alto consumo de carne fez com que o poder calórico dos alimentos aumentasse significativamente na dieta de nossos ancestrais hominídeos e transformasse nossa capacidade energética (Andrews; Johnson, 2020).

Com grande capacidade de locomoção e domínio do fogo como técnica de sobrevivência, nossos ancestrais logo se tornaram o que antropólogos e historiadores chamam de caçadores e coletores (Harari, 2015).

A atividade da caça e coleta era nômade e permitiu que os hominídeos pudessem ter uma dieta rica e saudável por um longo período de tempo, mais de 1,5 milhões de anos para *H. Erectus*, antecessor de diversas espécies de hominídeos, e da grande maior parte da existência da espécie *H. Sapiens*, (~300 mil anos), os quais até cerca de 20-10 mil anos atrás, praticavam esta forma de sobrevivência (Harari, 2015; Barnard, 2004).

Após este longo período de nomadismo e garimpo, os *H. Sapiens* que dedicavam seus dias como caçadores e coletores, desenvolveram o cultivo plantas, raízes, especialmente trigo, dominaram melhora sua capacidade de domesticar animais e pela primeira vez puderam se manter no mesmo local por longas gerações e estabelecer condutas sociais mais complexas (Harari 2015; Eknoyan, 2006; Barnard, 2004).

A chamada de Revolução Agrícola permitiu que nossos ancestrais pudessem dedicar mais tempo em outras atividades, das quais não precisavam percorrer longas distancias por comida, se abrigavam contra eventos climáticos e estocavam comida. Período este que daria início um cotidiano cada vez menos ativo de nossa espécie (Harari 2015; Barnard, 2004).

A partir destes últimos eventos que culminaram em também como grandes números de indivíduos *H. Sapiens* pudessem viver em sociedades complexas, o evento mais recente e importante que se pode destacar é a Revolução Industrial (Inglaterra, 1760) em que gradualmente o trabalho braçal e o uso da força animal perdem potencialmente espaço para máquinas a vapor e cada vez mais máquinas sofisticadas minimizaram o gasto energético humano em escala (Harari, 2015; Fogel 2004).

Avançadas tecnologias a partir do século XVIII, difundiram cada vez mais a disponibilidade e oferta de alimentos, o que pode ser classificado como a segunda Revolução Agrícola (Fogel, 2004) e proporcionaram o aumento da longevidade e crescimento econômico, entretanto redução da carga de trabalho e atividade física (Eknoyan, 2006).

Portanto, com o rápido desenvolvimento de novas tecnologias, o esforço necessário para o *H. Sapiens* realizar trabalho se tornou cada vez menor. Nas atuais condições, a inatividade física associada à um consumo energético excessivo, constrói um cenário ideal para o alastramento da obesidade no mundo.

2.2 Epidemiologia e Fisiopatologia da Obesidade

Atualmente, o número de crianças e adultos com sobrepeso ou obesos é cada vez maior, a Organização Mundial da Saúde considera a obesidade uma crise de saúde pública tão séria quanto a desnutrição, porém em maior escala, com alta incidência e prevalência (WHO, 2021; Eknoyan, 2006).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021) calcula-se que a epidemia de obesidade tenha triplicado desde 1975. Em 2016, o sobrepeso atingiu cerca de 39% da população mundial acima de 18 anos e a obesidade cerca de 13%. A taxa de obesidade deixou de ser alta apenas em países de alta renda e vem aumentando em cerca de 30% a mais em países em desenvolvimento com economia emergente (WHO, 2021).

A obesidade pode ser classificada através da medida padronizada mundialmente como índice de massa corporal (IMC). Este indicador, também preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil calcula a massa (em quilogramas) do indivíduo dividida pelo quadrado de sua altura (em metros).

A Organização mundial da saúde avalia que indivíduos adultos que apresentam IMC igual ou maior que 25 são considerados acima do peso e maior que 30 são frequentemente considerados obesos, e estão na faixa de risco para outras doenças crônicas associadas e apresentam maior taxa de mortalidade (WHO, 2021; Gonzalez, 2010).

No Brasil, uma pesquisa realizada pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde aponta que, em 2018, 55,7% da população adulta brasileira está com excesso de peso e 19,8% está obesa. Dados do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional também relatam que, 27,3% dos indivíduos adultos acompanhados na Atenção Primária no Brasil apresentaram obesidade, em 2018. (Ministério da Saúde, 2021)

Entre as principais causas de morte e agravos à saúde que atingem o indivíduo obeso destacam-se *Diabetes Mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer (WHO, 2021; Flegal, 2007).

Na obesidade, um dos principais fatores desencadeadores de doenças é a síndrome metabólica. Esta síndrome é caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo principalmente na região abdominal, evidenciada por disfunções do tecido adiposo, dislipidemias, inflamação, hipertensão e resistência à insulina e está fortemente associada à redução da qualidade e expectativa de vida (Després, Lemieux 2006).

Dentre estes danos causados pela obesidade e síndrome metabólica, destaca-se a resistência à insulina. Esta, por sua vez, é definida como uma ação reduzida do hormônio insulina nos tecidos alvos, principalmente fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (Iyer et al., 2010).

Caracterizada por hiperinsulinemia, normo ou hiperglicemia, os mecanismos que estabelecem relação entre resistência à insulina e obesidade não estão completamente claros, mas evidências apontam para um estado de inflamação crônica do tecido adiposo e alterações metabólicas específicas nos adipócitos que refletem no organismo de forma sistêmica (Iyer et al., 2010).

O tecido adiposo desempenha um importante papel de glândula endócrina na homeostasia do organismo, pois é capaz de secretar adequadamente substâncias chamadas adipocinas que possuem potencial parácrino e autócrino com ações hormonais e até mesmo imunológicas, porém, o excesso de adipócitos e o consequente quadro resistência à insulina acarretam amplas disfunções metabólicas neste tecido, como por exemplo alterações na secreção de adipocinas (Wernstedt-Asterholm et al., 2014).

Uma das mais importantes adipocinas, foco deste trabalho, se trata da a adiponectina, conhecida por seus efeitos antidiabéticos, por ser o peptídeo mais secretado pelos adipócitos e por possui importantes propriedades para a regulação do metabolismo oxidativo, balanço energético e resposta anti-inflamatória (Nigro et al., 2014).

Adiponectina foi incialmente descrita em 1995 por Scherer e colaboradores como "*adipocyte complement-related protein of 30 kDa, Acrp30*". Estes autores demonstravam que esta adipocina apresentavam forte interação com a insulina em cultura celular 3T3-L1 e também que a adiponectina se apresentava em diferentes complexos e pesos moleculares (Scherer, 1995) o que elevou e diferenciou as possibilidades de sua atuação (Wang; Scherer, 2016).

A adiponectina, é encontrada principalmente no plasma, constituída por 247 aminoácidos e secretada majoritariamente pelos adipócitos (Scherer; Williams; Fogliano, 1995; Hu et al., 1996; Nakano et al., 1996). Porém também pode ser encontrada no músculo esquelético, cardiomiócitos, linfócitos, placenta, testículos, ovários e nas glândulas pituitária e adrenal (Ngyuen, 2020).

A adiponectina é encontrada em abundância no sangue, entretanto sua possui uma relação inversa com a obesidade. Com a perda de peso e redução de gordura corporal há aumento de adiponectina circulante (Ngyuen, 2020). Porém, na síndrome metabólica e

obesidade ocorre um status inflamatório induzido pela infiltração de macrófagos no tecido adiposo, as células adiposas acabam pro produzir citocinas inflamatórias como TNF-α, interleucinas (IL-6), MCP-1, resistina, entre outras. Nestas condições a produção de adiponectina é drasticamente reduzida (Yanai H; Yoshida H, 2019).

A ligação da adiponectina e sua resposta celular dependem principalmente de dois receptores: adipoR1 e adipoR2, ambos acoplados a uma proteína adaptadora denominada APPL1 (Mao, 2006). Enquanto o receptor adipoR2 está predominantemente expresso no fígado, o receptor adipoR1 está preferencialmente mais expresso no tecido muscular (Yamauchi, 2003).

Hoje em dia sua ação é reconhecidamente hipoglicemiante, antioxidativa e antiaterogênica tem cada vez mais se tornado um interessante alvo terapêutico no tratamento da obesidade (Li et al., 2009; Esfahani et al., 2015).

Conhecidamente, através deste grande potencial para futuros alvos terapêuticos, modelos animais que superexpressam adiponectina são resistentes à indução de obesidade por dieta hiperlipídica (Otabe et al., 2007; Li et al., 2009).

Embora os receptores adipoR1 e adipoR2 diferem-se um pouco em suas vias de sinalização, com o uso de camundongos *knockouts* (KO) para ambos receptores, foi observado o acúmulo de triglicerídeos no fígado, resistência à insulina e intolerância à glicose (Yamauchi, 2007).

A resposta celular frente ao acoplamento de adiponectina aos receptores adipoR1/R2 consiste em uma cascata de reações químicas muito importantes para a via oxidativa através da ativação da via da proteína adenosina monofosfato ativada por proteína quinase (AMPK). Sendo o receptor adipoR1 mais intimamente ligado à ativação desta via, este receptor possui como funções: ativação da beta-oxidação de ácidos graxos, aumento na captação de glicose e da ativação do receptor nuclear ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPARα/γ), os quais funcionam como fatores de transcrição que promovem o metabolismo oxidativo. Já o receptor adipoR2 está mais associado à inibição da gliconeogênese hepática (Yamauchi, 2002; Tsushida, 2004).

Em suma, ambos receptores, adipoR1 e adipoR2 atuam como promissores alvos terapêuticos como demonstrado, por exemplo, através do aumento nos níveis de expressão de seus genes (RNAm) (Okada-Iwabu, 2015; Iwabu et al., 2016).

Portanto a intervenção por meio de treinamento físico aeróbio sob efeitos de um quadro de obesidade se torna necessária para o entendimento da resposta celular da via da adiponectina.

2.3 Integração metabólica promovida pelo tecido hepático

A obesidade é uma doença que se instala progressivamente com o passar do tempo devido aos maus hábitos de vida dos indivíduos.

Com progressão da doença, o fígado passar a ser um dos órgãos mais afetados. Na etapa inicial da obesidade, o fígado apresenta um acúmulo importante de triglicerídeos (TG) que caracteriza a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (Polyzos et al., 2010).

A teoria mais aceita e atual é a de múltiplas etapas ou *Multi Hits,* a teoria mais ampla e complexa, parte da resistência à insulina como evento principal, sendo este processo responsável por aumentar a lipólise e a produção de adipocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-6 e leptina) pelo tecido adiposo. Adicionalmente, a resistência à insulina também induz vias lipogênicas hepáticas e inibe vias de oxidação (beta – oxidação) e de efluxo lipídico (secreção de VLDL, produtos do colesterol). Tais efeitos da resistência à insulina no tecido adiposo e fígado, resultam em um aumento nos níveis de ácidos graxos no interior dos hepatócitos (Buzzetti et al., 2016; Fotbolcu; Zorlu, 2016).

O aumento do conteúdo lipídico hepático pode levar a diversos eventos maléficos que em última análise irão acarretar efeitos sistêmicos, como por exemplo a indução do estresse de reticulo endoplasmático, ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e indução de lipotoxicidade (Fotbolcu; Zorlu, 2016).

Eventos estes que podem se somar também com o aumento dos níveis circulantes de adipocinas pró inflamatórias e o aumento da absorção de lipopolissacarídeos intestinal provocado pela disbiose, pode levar ao desenvolvimento de inflamação crônica, ativação de vias apoptóticas e posteriormente, no fígado, acúmulo de fibrina (Buzzetti et al., 2016; Fotbolcu; Zorlu, 2016).

O receptor para adiponectina, AdipoR2, predominantemente expresso no fígado, é responsável por regular o metabolismo lipídico e glicêmico, além de ativar vias anti oxidantes e de processos anti inflamatórios (Kadowaki et al., 2006)

No fígado, a ação da adiponectina via AdipoR2, principalmente pode induzir a redução da lipogênese e o aumento da beta oxidação. A sensibilização do receptor AdipoR2, aumenta

a atividade de PPARα (Yamauchi et al., 2003; Neumeier et al., 2005) que induz a maior captação de ácidos graxos pelo fígado pela translocação do transportador de ácidos graxos FAT/CD36, e assim como uma maior atividade da CPT1 estimulando a beta oxidação, prevenindo desta forma o estoque de triglicerídeos (Buechler; Wanninger, et al., 2011). Por estes mecanismos em comum observados na prática clínica o exercício físico é altamente recomendado no tratamento de pacientes com NAFLD.

Apesar de evidências que a adiponectina pode mediar os efeitos benéficos do exercício físico aeróbio, ainda não está claro como ela é necessária para os efeitos do exercício na sensibilidade à insulina no fígado melhorando a esteatose hepática, uma comorbidade muito comum em indivíduos obesos.

2.4 Exercício Físico como Intervenção Terapêutica

O músculo estriado esquelético é um dos mais dinâmicos tecidos do corpo humano, contempla aproximadamente 40% do peso total de um indivíduo adulto saudável. É um tecido altamente resistente à estímulos por conta de sua plasticidade, e unicamente, é responsável por cerca de 30% da taxa metabólica basal (Zurlo et al., 1990; Frontera, 2014).

Além da perspectiva biomecânica, a dinâmica celular do músculo é bem diversificada, contém compartimentos proteicos estruturais, contráteis e regulatórios (Frontera; Ochala, 2014).

Dentre os diferentes tipos de fibras que compõem o músculo esquelético, pesquisas sobre a plasticidade muscular demonstraram que este tecido adulto pode sofrer conversão entre os tipos de fibras em resposta ao exercício físico ou em resposta a estados patológicos como à resistência à insulina e ao *Diabetes Mellitus* tipo 2 (Shortreed et al., 2009).

Em camundongos C57BL/6J estudos determinaram que o músculo sóleo é um ótimo alvo para análises sobre o metabolismo oxidativo por ser constituído principalmente de fibras do tipo I oxidativas (~37%) e IIa (~38%), enquanto o músculo gastrocnêmio é misto e contém tanto fibras do tipo I (~5%), IIa, IIx e IIb (~54%) oxidativas, como também glicolíticas (Augusto et al., 2004).

De uma perspectiva celular, o músculo esquelético participa de um importante papel dentro do metabolismo energético através do exercício físico onde se apresenta como o principal tecido envolvido na captação e utilização de glicose e ácidos graxos (Zurlo et al., 1990).

Visto que o sedentarismo está diretamente associado ao ganho de peso, uma intervenção terapêutica que possa conduzir o restabelecimento da homeostasia energética a fim de minimizar o surgimento de possíveis doenças é estritamente necessária.

A realização de exercício físico é uma excelente ferramenta não farmacológica no tratamento das desordens metabólicas sistêmicas: obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina, dislipidemias, hipertensão, hipoglicemia, *Diabetes Mellitus* (Pedersen, 2006).

Como já mencionado uma das principais linhas para o estudo da cascata de sinalização da Adiponectina relacionada à obesidade e ao exercício físico é a importância de seu estímulo à biogênese mitocondrial.

Destaca-se neste processo a participação do proliferador de peroxissoma 1 alfa (PGC1α), um coativador da transcrição gênica que atua na plasticidade de miócitos e possui notável função na capacidade oxidativa do tecido muscular através da melhor na transcrição de proteínas relacionadas a angiogênse, ao sistema anti oxidante e inflamatório (Rasbach, 2010; Handschin, 2010; Olesen et al., 2010).

Para garantir tais adaptações fisiológicas consistentes nos tecidos, é altamente utilizado o treinamento aeróbio, o qual promove alto gasto calórico, respostas neuroendócrinas, metabólicas, ajustes cardiovasculares e é o principal estímulo mecânico para a regulação do metabolismo oxidativo e glicolítico, o qual requer uma coordenação de múltiplos eventos celulares como a estimulação de enzimas mitocondriais , fatores nucleares respiratórios (NRF-1 e 2), fatores de transcrições, entre outros (Hawley et al., 2014).

Ademais, sistemicamente, o treinamento aeróbio regular é notoriamente capaz de melhorar a captação de glicose pelo músculo esquelético através do aumento da translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) independente de insulina, aumentar a sensibilidade à insulina, contribuir para a homeostase glicêmica, melhorar o transporte e oxidação de lipídeos, aumentar as concentrações de adiponectina e testosterona séricas em indivíduos obesos (Luciano et al., 2002; Richter; Hargreaves, 2013; Stanford; Goodyear, 2014; Moradi, 2015).

As vias principais que são comumente abordadas por conta de suas importâncias estão demonstradas na **Figura 1**.

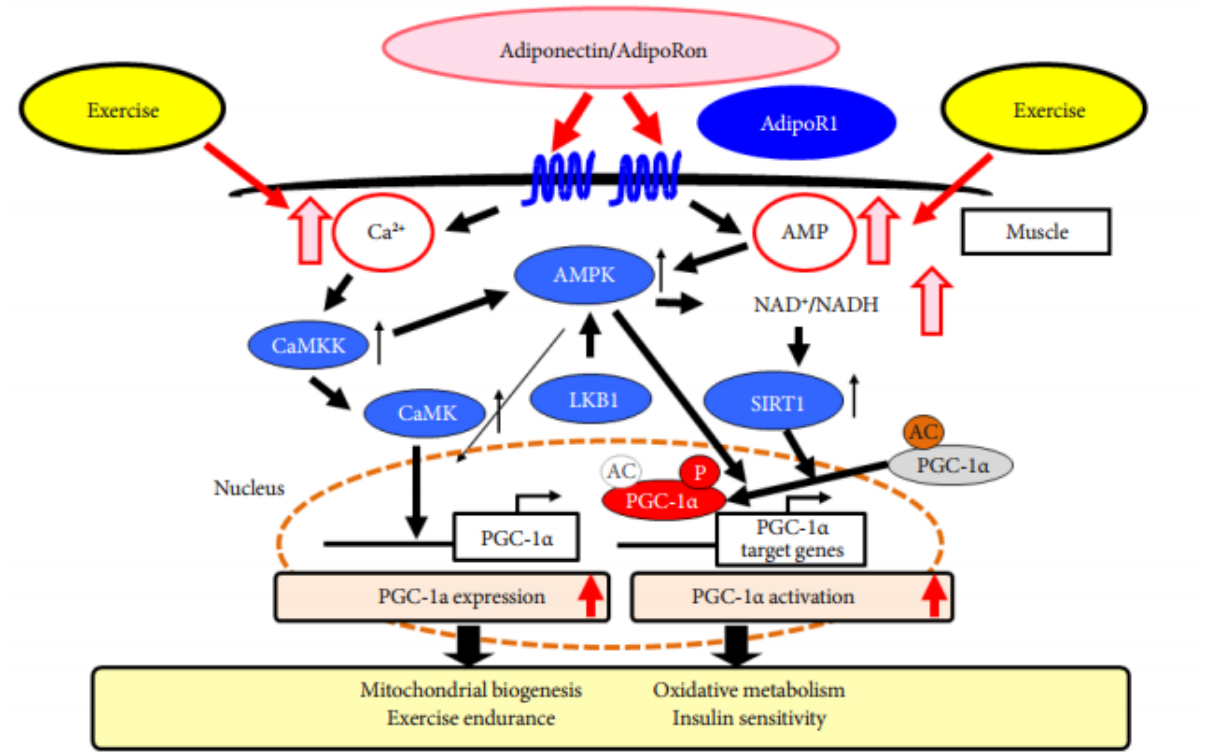

Figura 1. Via de sinalização da adiponectina.
Esquema exemplificando a transdução de sinal da adiponectina via receptor AdipoR1 em células musculares e a influência do exercício físico (Iwabu et al., 2015).

O treinamento de moderada a alta intensidade melhora a resistência à insulina sistêmica de camundongos obesos através do aumento da expressão dos próprios receptores de membrana adipoR1, e através da proteína sirtuína-1 (SIRT1), responsável pela ativação de PGC1α e a razão p-AMPK/AMPK no músculo esquelético em camundongos alimentados por dieta hiperlipídica (Cho, 2015).

Portanto, na célula muscular o acoplamento de adiponectina ao receptor adipoR1, resulta no aumento do influxo extracelular de Ca+2, processo que é de fundamental importância para a ativação do complexo CaMKK β (Ca+2 dependente de calmodulina quinase de proteína quinase β). Este complexo, em conjunto com a proteína LKB1 (*Liver Kinase B1*) são necessários para completa ativação da AMPK. Consequentemente, as proteínas AMPK e SIRT1, diminuem a acetilação e aumentam a expressão de PGC1α resultando em maior biogênese mitocondrial, ou seja, aumento do número de mitocôndrias e maior função respiratória, maior capacidade enzimática para beta oxidação de ácidos graxos e fosforilação oxidativa, e aumento de expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo oxidativo como

CPT1b e UCP3 (Iwabu, 2010; Himms-Hagen; Schrauwen, 2001; Finck; Kelly, 2006; Koves, 2013) como também descrito na **Figura 1**.

Corroborando com a ação benéfica da adiponectina via receptor AdipoR1, animais *knockout* para AdipoR1 no tecido muscular possuem menor tolerância ao exercício físico, revelando um comprometimento da via, ou seja, há menor fosforilação da AMPK, menor quantidade de PGC1α, disfunção mitocondrial e até mesmo diminuição de moléculas envolvidas com o processo de replicação do DNA mitocondrial, na transcrição de fatores nucleares respiratório (Iwabu, 2010).

Ou ainda outras regulações como a de expressão de peptídeos mitocondriais MOTS-c que também sofrem regulação de sua secreção ou produção promovidas diretamente da ativação da cascata APPL1 → SIRT1 → PGC1-α, que por sua vez, tem influência do tratamento com adiponectina e que melhora o quadro de resistência à insulina (Guo et al., 2020).

Toda as cascatas e possíveis melhoras sistêmicas promovida pela ação da ativação dos protagonistas da via da adiponectina não ocorre de forma isolada, Murphy, Watt e Febbraio, 2020 relatam e direcionam o papel de miocinas e hepatocinas de forma coordenada para a manutenção da homeostase energética como forma de *cross-talk* entre os tecidos.

Sendo assim, hipótese do presente trabalho consiste em verificar quais efeitos pró-metabólicos do exercício físico aeróbico são mediados pela via da adiponectina. Para tal, utilizamos camundongos *C57BL/6J* selvagens e nocautes para adiponectina com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do exercício físico e participação da via da adiponectina na melhora do quadro de obesidade, resistência à insulina e esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados neste estudo camundongos machos selvagens e nocautes para o gene da adiponectina (AdipoKO) (B6;129-Adipoq tm1Chan /J, The Jackson laboratory) (Ma, *et al.*, 2002) no *background* genético do C57BL/6J recém-desmamados criados no Biotério do

Departamento de Farmacologia – Unidade II (biotério de camundongos) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12-12h à temperatura de 23°±2°C, alimentados com ração padrão Nuvilab (Nuvilab-Nuvital Nutrients Ltda., Paraná, Brasil) e água *ad libitum* até o início do tratamento.

3.2 Aspectos Éticos

O experimento foi realizado de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008). Todos os procedimentos adotados neste estudo estão aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo n° 21/2016) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.3 Genotipagem dos animais adipoKO e seus irmãos selvagens

Para obtenção dos animais adipoKO e seus irmãos selvagens, fêmeas da linhagem Adipoqtm1Chan foram cruzadas com machos da linhagem C57Bl6/J e a partir dos filhotes heterozigotos, foram formados novos casais. A genotipagem foi realizada conforme protocolo obtido da empresa *The Jackson Laboratory* (https:// www2.jax.org), com algumas modificações. Para extração de DNA dos animais foram coletados 0,5cm da cauda, lavados com H2Od e incubadas à 55°C overnight em tubos de 1,5ml contendo 8uL de Proteinase K e 50uL de EAR Buffer (Tris HCl pH 8,5, EDTA, SDS, NaCl, H2Od). Após incubação foi adicionado 500ml de TE (Tris Base e EDTA pH 8,0) e mantido em geladeira. Para verificar o genótipo foi realizada a reação em cadeia da polimerase, onde foram utilizados 20µL de volume final para cada reação, sendo, 4uL de amostra de DNAg; 1mM de cada primer (oIMR8192, oIMR8193, oIMR8194) e 10uL de Amplitaq Gold 360 master mix 2x concentrado e 3µL de água livre de nucleases. O protocolo de amplificação foi de 95o C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 94º C por 30s, 64º C por 1min30s e 72º C por 1min e extensão final à 72º C por 2 min, em termociclador Veriti (Life Technologies). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para detecção dos genótipos. Para a etapa de eletroforese foi utilizado gel de agarose 1,3%: agarose em tampão TBE (Tris Base, ácido Bórico e EDTA pH 8,0). Os produtos da reação de PCR foram aplicados e submetidos a corrente de 150V por 40

min. A seguir o gel foi corado com brometo de etídeo 0,5mg/mL e as bandas obtidas foram visualizadas em luz UV em fotodocumentador AI600 (GE).

A identificação dos genótipos foi feita pela visualização de bandas referentes ao tamanho do *amplicon* formado, da seguinte maneira: Mutante = 500 pb; Heterozigotos = 850 pb e 500 pb; Selvagens: 850 bp (**Figura 2**).

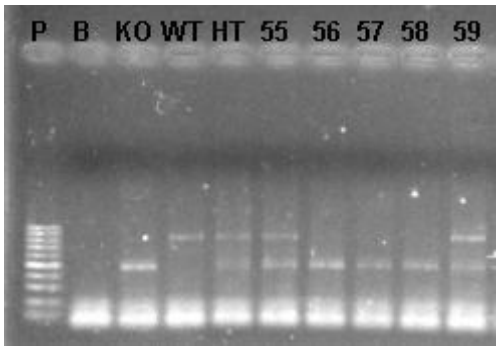

Figura 2. Genotipagem dos animais wild type e knockouts para adiponectina.
Os *amplicons* foram submetidos a eletroforese submersa em gel agarose 1,3% e separados após 40 min de corrida a 150V. O gel foi incubado por 15 min com brometo de etídeo e visualizado em luz UV. Foto representativa das bandas obtidas após visualização e captura da imagem obtida.P: padrão de tamanho molecular de 100bp; B: branco ou controle sem amostra; KO, WT, HT: controles positivos- WT: selvagem, banda única de 850bp; HT: heterozigoto, banda dupla de 850bp e 500bp; KO: mutante, banda única de 50. 55, 56, 57, 58 e 59, animais nascidos e genotipados, sendo classificados como HT: 55 e 59; KO: 56, 57 e 58.

3.4 Desenho Experimental

Na **Figura 3** está ilustrado o desenho experimental. Com 3 semanas de idade, os animais foram genotipados e os animais *AdipoKO* foram aleatoriamente separados em: dieta controle, (C: 76% Kcal carboidratos, 9%Kcal gordura e 15%Kcal) ou dieta Hiperlipídica (H: 26%Kcal carboidratos, 59%Kcal gordura e 15%Kcal proteínas, PragSoluções, Brasil) por 4 semanas.

Após este período os animais continuaram a receber dieta padrão (**grupo C**) ou dieta hiperlipídica (**grupo H**) por mais 8 semanas e permaneceram em suas caixas, no entanto parte dos animais obesos iniciaram o protocolo de exercício físico (**grupo HT**) em esteira rolante durante também as próximas 8 semanas de experimento.

Uma semana antes da eutanásia dos animais realizamos os testes intraperitoneal de tolerância à glicose (ipTTG), insulina (ipTTI) e piruvato (ipTTP). Finalizadas as 12 semanas

do protocolo de dieta e exercício físico, após 48h a última sessão de treinamento os animais foram eutanasiados em câmara de CO2. Todos os animais permaneceram em jejum de 8 horas antes dos procedimentos de extração dos tecidos. Foram coletadas amostras de sangue, tecido adiposo, tecido muscular esquelético, sóleo e fígado. O músculo sóleo e o fígado foram utilizados para análise histológica, extração de proteínas e extração de RNA.

Neste estudo foram utilizados animais selvagens (*Wild Type*) com as mesmas condições dos animais *AdipoKO* (grupos C, H e HT) para determinação do efeito do treinamento na concentração de adiponectina sérica.

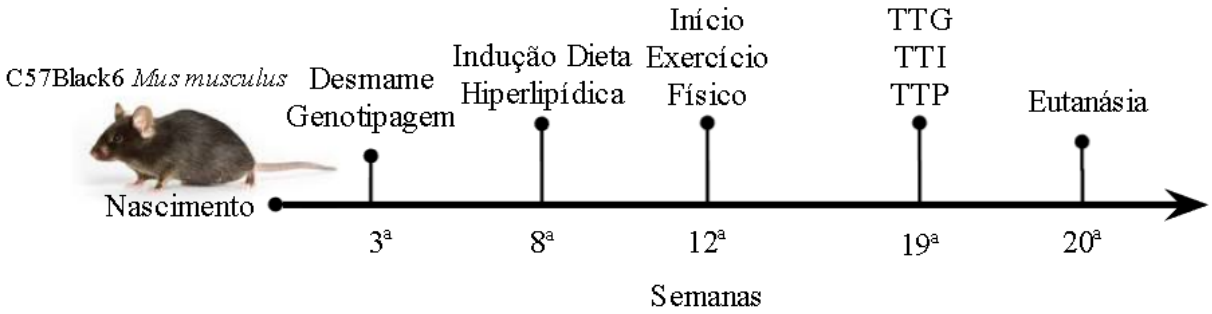

Figura 3. Desenho Experimental.
Linha do tempo esquematizando as etapas do experimento, do nascimento à eutanásia. TTE-teste de tolerância ao esforço; TTG – Teste de tolerância à glicose; TTI – Teste de tolerância à insulina, TTP - Teste de Tolerância ao Piruvato.

3.5 Protocolo de Treinamento Físico e Teste de tolerância ao esforço (Tmáx)

Uma semana prévia ao início do protocolo de exercício físico, os animais foram adaptados à esteira rolante (10-20 m/min/dia), durante 5 dias.

O Tmáx teve início com velocidade inicial de 6 m/min. A cada 3 min houve incremento na velocidade de 3 m/min até a exaustão completa do animal. A exaustão foi determinada quando o animal não manteve o padrão de corrida na esteira e permaneceu ao fim de sua baia. Quando o animal entrou em exaustão a velocidade em que estava é registrada como velocidade máxima atingida no teste. O teste foi repetido na 4ª semana do experimento para identificar as adaptações do rendimento e corrigir as velocidades médias dos animais.

As sessões de exercício físico foram realizadas em esteira rolante, durante 8 semanas, com duração de 60 minutos, cinco vezes por semana (Segunda a Sexta, às 17:00-18:00h). A

velocidade utilizada no treinamento foi de 50% da velocidade máxima atingida no teste de tolerância ao esforço (Hoydal, 2007).

3.6 Pesagens e Análise de Composição corporal

Todos os animais foram semanalmente pesados individualmente e foi registrado o consumo alimentar por gaiola durante todo período do experimento. Após eutanásia, foram pesados os depósitos de gordura, fígado e músculo esquelético para identificar adiposidade e massa muscular, respectivamente.

3.7 Teste de tolerância à glicose (ipTTG)

Para a construção da curva glicêmica após sobrecarga de glicose, uma semana antes do fim do experimento, os animais em jejum prévio de 6 horas receberam uma dose de glicose (2g/kg p.c.) por injeção intraperitoneal. Foram coletados 20µL e 5µL de sangue capilar caudal para determinação da concentração de insulina e de glicose, respectivamente, nos seguintes tempos: 0 (pré-injeção), 30, 60 e 90 minutos após a administração de glicose (Masi, 2012).

3.8 Teste de tolerância à insulina (ipTTI)

Para a construção da curva glicêmica após sobrecarga de insulina, após 3 dias realizado o TTG, os animais em jejum prévio de 6 horas receberam uma dose de insulina (0.75 UI/kg de peso corpóreo) por injeção intraperitonial. A glicemia foi mensurada a cada 3 minutos através do glicosímetro (Accu-CheckPerforma, ROCHE®) através de coleta de sangue caudal, nos seguintes tempos: 0 (pré-injeção), 3, 6, 9, 12, 15 e 18 min após a administração de insulina para delinear a curva insulinêmica. Para o cálculo da constante (k) da taxa de desaparecimento da glicose plasmática k(ITT) em %/min foi utilizado a análise estatística de regressão linear. Um menor kitt indica menor sensibilidade à insulina.

3.9 Teste de tolerância a piruvato (ipTTP)

Animais em restrição alimentar de 16 horas receberam sobrecarga de piruvato (2 g/kg de peso corpóreo) por injeção intraperitoneal. Para construção da curva glicêmica, retirou-se

sangue da cauda dos animais e, utilizando um glicosímetro (Accu-Chek Performa - Bayer, Basileia, Suíça) determinou-se a glicemia nos tempos 0 (pré-injeção), 10, 20,30, 45, 60, 75 e 90 minutos após a injeção de piruvato. Os valores glicêmicos obtidos foram utilizados para construção da curva glicêmica e a área sob a curva foi calculada.

3.10 Parâmetros Plasmáticos

O sangue foi coletado via punção cardíaca para as determinações bioquímicas no soro. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 x g por 15 min à 4°C para obtenção do soro e o sobrenadante guardado no freezer -80°C. A concentração sérica de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos foram avaliados por ensaios enzimáticos, através de kits específicos (Bioclin®). As concentrações de LDL e VLDL foram calculadas a partir da equação de Friedewald para lipoproteínas de baixa densidade (Friedewald, et al., 1972) A adiponectina sérica foi medida por ELISA utilizando o kit EZMADP-60K (Millipore).

3.11 Análises Histológicas

O sóleo foi armazenado em Nitrogênio líquido emblocado em meio Tissue-Tek (O.C.T. Compound, Interprise®). Cortes transversais foram realizados através do equipamento Criostato (LEICA® CM3050 Biosystems, Wetzlar, Alemanha), em 10µm de espessura, à -27°C e capturados em lâminas histológicas. Para fixação dos cortes, as lâminas foram levadas em estufa por 15min à 37°C. Foram confeccionadas no mínimo 3 lâminas de cada animal, onde foram coletados no mínimo 3 cortes por lâmina.

O fígado foi armazenado em paraformaldeído (4%) durante 24h e transferidos para solução de sacarose 30% e a seguir incorporadas no composto *Tissue-Plus Optimal Cutting Temperature* (OCT) (Fisher *HealthCare*, Houston, TX, EUA). Blocos de tecido congelados foram cortados em secções de 10 µm de espessura usando o criostato Leica CM3050 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha).

Para fixação dos cortes, as lâminas foram levadas em estufa por 15 min à 37°C.

Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) ou Sudan Black para análise histológica.

3.11.1 Hematoxilina e Eosina

As lâminas foram coradas com Hematoxilina por 5 min em cubetas de vidro e lavadas em água corrente por 1 min. Em seguida, foram coradas com Eosina durante 1 min e lavadas em água corrente por até 1 min. Após passarem pela bateria de desidratação, as lamínulas foram posicionadas em meio Permount. Para cada animal, 4 campos aleatórios de ao menos 3 cortes diferentes foram fotografados em ampliação de 10x em microscópio óptico. A área de secção transversa de 100 fibras/campo foi mensurada através do *Software Image J* (NIH, Bethesda, MD).

3.11.2 Sudan Black

Os cortes foram fixados em formalina 10%, lavados rapidamente em água destilada para retirar o excesso. As lâminas foram imersas em solução de propileno glicol por 5min em cubetas de vidro e posteriormente foi aplicado a solução Sudan Black durante 7 min sobre as lâminas com pipeta. Novamente a solução de propileno glicol (85%) foi adicionada, por fim as lâminas foram lavadas com água destilada, esperou-se secar o excesso de água e adicionou- se lamínulas. Foram fotografados as lâminas em microscópio óptico em aumento de 10x e as fotografias dos cortes foram quantificadas em escala de cinza através do *Software Image J* (NIH, Bethesda, MD) , onde mais escuro significa mais número de lipídeos presentes no tecido.

3.12 Quantificação da expressão de RNAm por PCR em tempo real

O RNA total do fígado e do sóleo dos animais de cada grupo foi extraído pelo reagente Trizol, de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado e avaliado sua pureza pela relação A260/A280 (nm) em espectrofotômetro Biodrop.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o kit *High Capacity* (*Life Technologies*) a partir de 400 ng de RNA total.

Foram avaliadas a expressão de genes que participam da via de sinalização da adiponectina no fígado *(Acad11, Acsl3, Adipor2, G6pc, Pepck, Ppargc1a, Ppara, Pparγ*) e músculo esquelético (*AdipoR1, Pgac-1α, Cpt1b),* e para normalização destas amplificações foi foi utilizado o gene *Hprt1* como constitutivo, o qual se mostrou estável. Tais análises foram

quantificada por reação de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR (RT-qPCR) em tempo real.

Os *primers* utilizados estão descritos na **Tabela 1**. As reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata no aparelho *QuantStudio3* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) e os resultados analisados pelo software *QuantStudio™ Design & Analysis* (*Applied Biosystems*). A expressão gênica relativa foi determinada pelo método matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak; Sschmittgen, 2001).

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados para quantificação da expressão de RNAm por PCR quantitativo

Símbolo Gene	***Primer Forward* (5'- 3')**	***Primer Reverse* (5'- 3')**
Acad11	*CCTTTTCAAAACAATCCTTGGTGTT*	*TGTGTTGTGTGGGCCTCTTTAA*
Acsl3	*GGAGCTCCTGCAGACCCTATT*	*CTGAGCCCCAGAGCGTTCAC*
Adipor2	*AGGCTGGCTAATGCTTATGG*	*GATGTGGAAGAGCTGATGAGAG*
FGF21	*TGTAAAACGACGGCCAGT*	*CAGGAAACAGCTATGACC*
G6pc	*CGTATGGATTCCGGTGTTTG*	*GGGAAAGTGAGCAGCAAGGT*
Hprt1	*CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA*	*CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA*
Pepck	*ATGCTGATCCTGGGCATAAC*	*GTCTTCCCACAGGCACTAGG*
Pgc1a	*CACCAAACCCACAGAAAACAG*	*GGGTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG*
Ppara	*TCGAATATGTGGGGACAAGG*	*TCTTGCAGCTCCGATCACAC*
Pparg	*CAAACCTGATGGCATTGTGAG*	*ATCTTAACTGCCGGATCCAC*

3.13 Quantificação da expressão das proteínas alvo por Western Blotting

Foram avaliados a expressão proteica de genes que participam da via de sinalização da adiponectina no tecido hepático, Cpt1b e Ppargc1a. Para a extração e separação das proteínas, o fígado foi homogeneizado em tampão RIPA e as proteínas totais foram extraídas. O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Uma alíquota com 30 μg de proteínas em tampão de amostra (Tris-HCl 100mM pH 6.8; mercaptoetanol 5%; SDS

2%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,01%) foi submetida à eletroforese SDS-PAGE 10% em condições desnaturantes. (SDS-PAGE) segundo Sambrook e Russel, 2001. As proteínas fracionadas em gel foram transferidas para membrana de PVDF em cuba de eletroforese (250 mA por 1 h). A eficiência de transferência foi avaliada pela coloração da membrana de nitrocelulose em Ponceau S 0,2% por 3 min. A detecção das proteínas de interesse foi realizada através do bloqueio da membrana por 1 h e 30 min à temperatura ambiente, com BSA a 5% em TBS [Tris-HCl 20 mM, (pH 7,5), NaCl 0,9%] para minimizar as ligações inespecíficas. Posteriormente, as membranas foram incubadas, sob agitação, em TBST (TBS com 0,1% de Tween 20) contendo os anticorpos primários (1:1000) Cpt1a (Abcam ab128568, anti-Rb, 88 KDa) e Pparcg1a (Abcam ab54481, anti-Rb, 105 KDa) por no mínimo 12 h, à 4ºC. Após 3 lavagens de 10 min com TBST, as membranas foram incubadas com seu respectivo anticorpo secundário com peroxidase (diluído 1:10000 em TBST) por 2 h a temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com TBST. As bandas foram reveladas através de quimioluminescência por incubação das membranas com o reagente "*Pierce ECL western blotting substrate"* (®*ThermoScientific*) e visualizadas pelo escaneamento da membrana no equipamento *C-digit* (®*Licor*).

3.14 Análise Estatística

Os dados de quantificação foram informados como média +/- desvio padrão (DP) e submetidos à análise estatística ANOVA de uma via ou duas vias quando necessário seguido do pós teste de Tukey e nível de significância $p<0.05$, sendo (a) versus C e (b) versus H (*PrismGraphPad Software*, Inc. San Diego, CA, EUA, versão 8.0).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do treinamento aeróbio na concentração de adiponectina plasmática

Para avaliar o efeito do treinamento na performance dos animais, realizamos um teste de tolerância ao esforço antes de iniciar o treinamento e após 4 semanas para corrigir a velocidade do treino. De acordo com os resultados obtidos, tanto animais WT como KO alimentados com dieta controle ou hiperlipídica apresentaram maior velocidade máxima após 4 semanas de treinamento, não diferindo entre os genótipos (**Figura 5**).

Tabela 2. Teste de Tolerância de Esforço (Tmáx)

		Wild Type		*Knockout*	
Teste	**Parâmetros**	**C**	**HT**	**C**	**HT**
	Velocidade (m/min)	21±2,45	19,5±3,87	21,6±4,45	21,6±2,51
1°	Distância (m)	245,25±55,17	216±81,5	264,6±99,94	259,2±57,06
	Tempo (min)	18±2,45	16,5±3,87	18,6±4,45	18,6±2,51
	Velocidade (m/min)	30,75±2,87[a]	31,5±3[b]	30,6±2,5[a]	31,2±2,68[b]
2°	Distância (m)	513±90,9[a]	537,75±94,5[b]	507,6±79,64[a]	527,4±85[b]
	Tempo (min)	27,75±2,87[a]	28,5±3[b]	27,6±2,51[a]	28,2±2,68[b]

(a)(b) $p < 0,05$ por *Two Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; média ± Desvio Padrão; n = 4-5 animais por grupo. Comparação entre 1° e 2° Teste, sendo (a) *versus* C e (b) *versus* HT. C, controle e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

O treinamento foi capaz de promover adaptações fisiológicas. Após o 2° teste aplicado, (4ª semana), os animais tiveram suas velocidades máximas superadas significativamente bem como a distância percorrida no teste e melhora no tempo de exaustão.

Nos animais WT avaliamos o efeito do treinamento aeróbio na concentração sérica de adiponectina e, conforme nossa hipótese, o treinamento aeróbio dos animais selvagens aumenta a concentração de adiponectina no soro (**Figura 4**). Medimos a adiponectina também em animais *adipoKO* para confirmação do fenótipo e a presença de adiponectina não foi detectada no soro dos animais (**Figura 4**).

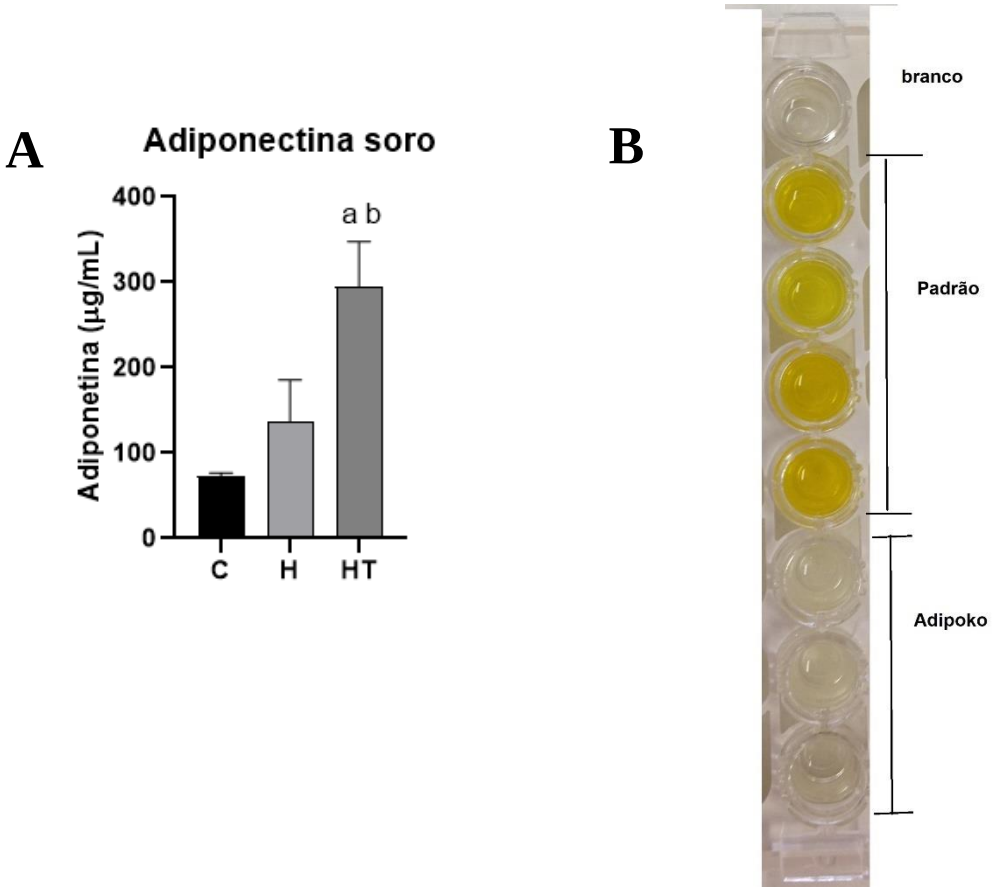

Figura 4. Efeito do treinamento aeróbio na concentração sérica de Adiponectina em animais selvagens. (a)(b) $p < 0,05$ por *One Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; média ± Desvio Padrão; (a) *versus* C e (b) *versus* H. n = 4-5 animais por grupo. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

A concentração de adiponectina foi medida por ELISA e calculada com base na curva padrão (B) ou está mostrado o resultado negativo para o soro de animais *AdipoKO* (C).

Ritchie e colaboradores (2014) demonstraram que, mesmo na ausência de Adiponectina a qual possui um papel regulatório para a biogênese mitocondrial do músculo, os animais *knockouts* não apresentaram diferenças no volume máximo de oxigênio, taxa respiratório, ou tempo de exaustão durante as 8 semanas de exercício comparados aos animais selvagens. Os resultados destes autores mostraram que proteínas e marcadores mitocondriais não obtiveram diferenças para ambos os genótipos mesmo em músculos menos oxidativos que o sóleo, como por exemplo o músculo extensor longo dos dedos e gastrocnêmio.

A partir desse resultado, em que a adiponectina aumenta no soro dos animais obesos treinados selvagens, fomos então investigar o efeito da deleção de adiponectina nos efeitos benéficos promovidos pelo exercício físico.

Os efeitos do mesmo protocolo de treinamento aeróbio em animais selvagens estão descritos em resultados prévios de nosso laboratório em Mendonça et al. (2020), "*Aerobic exercise training regulates serum extracellular vesicle miRNAs linked to obesity to promote their beneficial effects in mice*".

4.2 Efeito do treinamento aeróbio nos parâmetros metabólicos de animais AdipoKO

Tabela 3. Aspectos da obesidade e parâmetros metabólicos dos animais *AdipoKO*.

Parâmetro	C	H	HT
Peso inicial (g)	23,3 ± 0,5	20,7 ± 1,2	20,8 ± 0,8
Peso final (g)	25,5 ± 0,6	41,3 ± 4,7 [a]	24,4 ± 0,9 [b]
Ganho de Peso (g)	3,3 ± 0,5	20,7 ± 4,5 [a]	3,6 ± 0,5 [b]
Consumo Alimentar (g/dia/grupo)	15,07 ± 3,03	11,57 ± 1,36 [a]	10,49 ± 1,56 [a]
Consumo Calórico (kcal/dia/grupo)	61,01 ± 9,92	64,94 ± 11,59	55,75 ± 8,23
Glicemia em jejum (mg/dL)	139,21 ± 2,74	231,47 ± 12,42 [a]	292,15 ± 17,65 [a]
TG Plasmático (mg/dL)	66,82 ± 12,69	68,62 ± 7,63	61,87 ± 13,49
Colesterol Total (mg/dL)	130,67 ± 26,69	141,33 ± 27,97	113,8 ± 18,95
HDL-C (mg/dL)	82,31 ± 26,87	115,9 ± 39,68	112 ± 22,57
LDL-C (mg/dL)	35 ± 9,56	31,04 ± 14,22	26,12 ± 11,5
VLDL-C (mg/dL)	13,36 ± 2,53	13,72 ± 1,56	12,37 ± 2,69
Gordura Epididimal (mg)	335,6 ± 71,3	1917,5 ± 193,1 [a]	507,9 ± 73,1 [b]
Gordura Mesentérica (mg)	193,6 ± 46,2	608 ± 276,4	107,5 ± 37,1 [b]
Gordura Marrom (mg)	57,68 ± 5,61	120,97 ± 34,80	84,66 ± 26,45
Gordura Retroperitoneal (mg)	71,45 ± 19,5	557,2 ± 11,5 [a]	150,9 ± 54,8
Fígado (g)	0,99 ± 0,05	1,453 ± 0,21 [a]	0,90 ± 0,67 [b]
Músculo Sóleo (mg)	8,03 ± 0,98	9,47 ± 5,12	6,6 ± 1,03
Músculo Gastrocnêmio (mg)	133,95 ± 8,94	149,1 ± 12,55	126,04 ± 13,9

Comprimento da Tíbia (cm)	1,57 ± 0,029	1,62 ± 0,026	1,58 ± 0,031
AUC ipGTT (AU)	33277 ± 8403,1	68533 ± 7232,9 [a]	70724 ± 17596 [a]
K_{ITT} %/min	5,03 ± 1,2	0,61 ± 0,41 [a]	4,32 ± 0,72 [b]
AUC ipPTT (AU)	17270 ± 1486,2	15645 ± 1187,4	14692 ± 1356,5

(a) (b) $p < 0,05$ por *One Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; média ± Desvio Padrão; (a) *versus* C e (b) *versus* H. n = 4-5. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

Animais *AdipoKO* alimentados com dieta hiperlipídica ganharam peso em comparação ao grupo controle e como demonstrado na **Tabela 3**, o protocolo de exercício físico atenuou o ganho de peso a nível do controle. Animais AdipoKO que receberam a dieta hiperlipídica e foram submetidos ao treinamento consumiram menor quantidade de alimento (g), no entanto ingeriram a mesma quantidade de calorias (**Tabela 3**). Logo, a perda de peso é atribuída ao exercício e descarta a possibilidade de uma menor ingestão alimentar.

Foram retirados e pesados os depósitos de tecido adiposo epididimal, mesentérico e marrom. No tecido adiposo epididimal houve um aumento de gordura no grupo HT em relação ao grupo H, provavelmente devido à uma redistribuição de gordura entre os principais depósitos deste tecido, visto que o treinamento dos animais obesos atenuou a massa desses tecidos (**Tabela 3**).

Os tecidos sóleo e fígado foram coletados e pesados após eutanásia dos animais. O peso do músculo sóleo, alvo de estudo no projeto, não demonstrou diferença significativa. Na **Tabela 3**, observamos que o grupo que recebeu dieta hiperlipídica teve aumento da massa hepática e o treinamento aeróbio reverteu esse incremento de peso. Provavelmente o aumento da massa do fígado dos camundongos obesos sedentários se deve ao acúmulo de lipídios ectópico causado pela ingestão de dieta hiperlipídica.

O protocolo de exercício físico e/ou a dieta hiperlipídica não modificaram a concentração de triglicerídeos plasmáticos e de colesterol total e seus subprodutos, HDL, LDL e VLDL como pode ser observado na **Tabela 3**. Durante o exercício físico os adipócitos aumentam a hidrólise dos estoques de TG e liberam ácidos graxos na corrente sanguínea (Hawley et al., 2014), embora encontrados valores menos em nossas dosagens de lipídeos plasmáticos não foram significantes estatisticamente.

No PTT, apesar dos animais *AdipoKO* obesos apresentarem maior glicemia após em jejum de 16h, não houve diferença no perfil glicêmico após desafio com piruvato (**Figura 4, Tabela 3**).

Após PTT, observamos que os animais obesos estavam intolerantes à glicose independente do treinamento, ou seja, o protocolo de treinamento não foi eficaz em reduzir a intolerância à glicose induzida pela ingestão de dieta hiperlipídica nos animais *AdipoKO* (**Figura 5, Tabela 3**).

Na **Figura 5** observa-se que os animais obesos apresentaram uma menor sensibilidade à insulina indicada pelo K_{ITT} (**Tabela 3**), quando comparado ao grupo que recebeu dieta balanceada, e o treinamento foi capaz de restaurar a sensibilidade à insulina dos animais obesos, indicando que a deleção de adiponectina não afeta a sensibilidade à insulina.

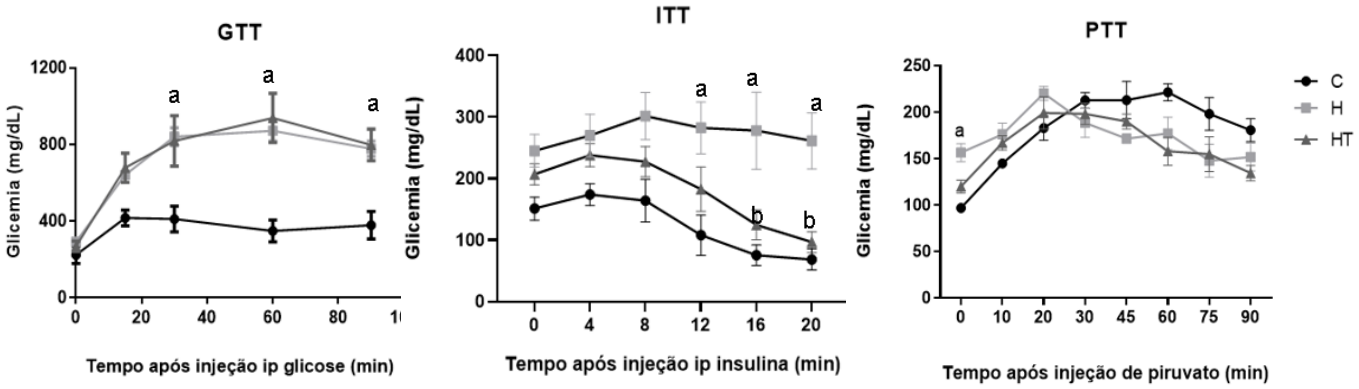

Figura 5. Efeito do treinamento aeróbio no metabolismo da glicose. (a) (b) $p < 0,05$ por *One Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; média ± Desvio Padrão; (a) *versus* C e (b) *versus* H. n = 4-5. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

Atividade regular de atividade física está associada à inúmeras adaptações fisiológicas, como por exemplo maior sensibilidade à insulina (Goodyear LJ, 1998), maior sensibilidade à leptina (Dyck DJ, 2005), redução da pressão arterial (Comelissen VA, 2013) e composição corporal (Stiegler P, 2006). A literatura aponta diversos estudos mostrando divergências entre a relação: consumo energético versus níveis de atividade física. Em sua revisão, Beaulieu, K e colaboradores (2016) encontram um número maior de estudos onde houve maior consumo energético em indivíduos ativos fisicamente comparados à grupos de indivíduos com atividade física moderadas ou inativos.

Porém há dados que mostram que o aumento de atividade física ou exercício não estabelecem relação direta com o aumento do consumo energético agudo ou a longo prazo (Donnelly JE, 2016).

Há grandes variações metodológicas e muitos estudos consideram apenas o consumo de macronutrientes e não avaliam de maneira mais rigorosa os componentes das dietas e as condições dos praticantes de atividade ou exercício físico. Além de que, o controle do apetite envolve regulações energéticas especializadas realizadas pelo sistema nervoso central. Em indivíduos obesos, o hormônio leptina, responsável pela sensação de saciedade, tem sua sensibilidade reduzida no tecido hipotalâmico comprometendo a homeostase energética do organismo (Schwartz MW, et al 2000). Singh, P e colaboradores (2015) indicam que o desequilíbrio entre leptina e adiponectina causado pela obesidade pode ser prejudicial, uma vez que evidências sugerem que os níveis de leptina podem regular a expressão de adiponectina. Aparentemente, há um limiar de massa corporal entre sobrepeso e obesidade em que a adiponectina é capaz de realizar os ajustes metabólicos necessários para promover sensibilidade à insulina entre outras melhorias metabólicas.

Assim como a leptina, a adiponectina é uma adipocina secretada pelas células adiposas, porém paradoxalmente, seus níveis se encontram reduzidos na obesidade (Kadawaki T, 2006; Arita Y, 1999).

Esta relação inversa entre obesidade e adiponectinemia pode ajudar a elucidar o ganho de massa corporal nos animais *adipoKO*. No presente estudo, os animais *adipoKO* alimentados com dieta hiperlípidica ganharam peso em comparação ao grupo controle e como demonstrado na **tabela 2**, o protocolo de exercício físico atenuou o ganho de peso a nível dos animais controle. Entretanto, os mecanismos moleculares sobre o ganho de massa corporal e a expressão de adiponectina permanecem pouco elucidados, haja visto que em humanos obesos saudáveis, altos níveis de adiponectina podem indicar boa função cardiovascular (Aguilar-Salinas CA, 2008) ou ainda, como demonstrado por Heilbronn LK (2013), em conjunto com o fator de crescimento do fibroblasto (FGF-21), indicar efeitos protetores compensatórios (**Figura 6**).

O protocolo de exercício físico utilizado neste estudo, melhora a intolerância à glicose em camundongos selvagens obesos como visto por Mendonça et al., 2020. Corroborando com nossos resultados, Ritchie e cols (2014) realizaram protocolo de 8 semanas de treinamento em esteira para ambos os genótipos (*AdipoKO versus Wild Type*) alimentados com dieta padrão e demonstraram não haver diferença na presença ou não de adiponectina para o teste de tolerância

à glicose. A ausência de efeito do treinamento em animais *AdipoKO* é bem interessante e pode auxiliar no entendimento dos mecanismos pelo qual o exercício físico melhora a homeostase da glicose.

Deste modo, para tentar explicar a falta de eficácia em reverter a intolerância à glicose pelo exercício avaliamos a expressão hepática de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (Pepck) e glicose-6-fosfatase (G6Pase), enzimas relacionadas à glicogenólise e gliconeogênese.

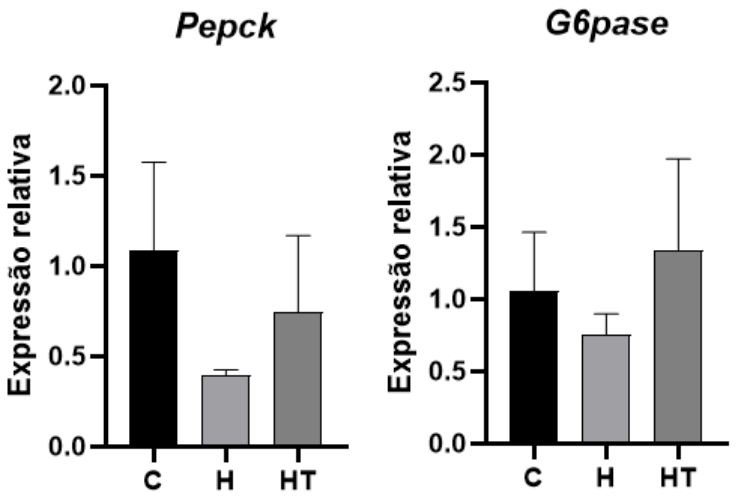

Figura 6. Efeito do exercício na expressão de RNAm hepática de Pepck e G6pase. (a) (b) $p < 0,05$ por *One Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; média ± Desvio Padrão; (a) *versus* C e (b) *versus* H. n = 4-5. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

A adiponectina é conhecida pro suprimir ambos eventos hepáticos glicogenólise e gliconeogênese através da inibição de genes envolvidos na produção de glicose (Wang, 2016) e por reduzir taxas enzimáticas para a produção da glicose ($C_6H_{12}O_6$) através da ativação da AMPK→PPARα (Yanai H; Yoshida H, 2019).

A insulina, sensibilizada pelo treinamento, suprime o nível de glicose no plasma pela inibição da produção de glicose no fígado e por promoção da eliminação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo, eliminação esta, também dirigida pelo exercício físico. Por outro lado, glucagon e glicocorticóides aumentam níveis de glicose por meio da ativação da gliconeogênese, e da ativação da glicogenólise, no fígado e redução da utilização de glicose no músculo esquelético, no caso dos animais sedentários (Liang H, 2006). Neste estudo, embora alguns animais isolados obtiveram uma resposta ao treinamento positiva na para estas enzimas, não foi encontrado diferença total nos grupos nos genes das enzimas que correspondem à produção de glicose.

Foi demonstrado que a adiponectina também é um mediador dos efeitos do FGF21, visto que animais *AdipoKO* são refratários aos efeitos terapêuticos do FGF21, pois tratamentos com FGF21 melhoram a expressão de adiponectina em adipócitos e sua seus níveis séricos e como consequência melhora da hiperglicemia, hipertrigliceridemia, resistência à insulina e esteatose hepática associados à obesidade (Lin Z, et al. 2013).

O FGF21 foi incialmente visto como um elemento estimulador à captação de glicose no tecido adiposo e estudos posteriores com a superexpressão deste fator mostraram também que ocorre a melhora da sensibilidade à insulina sistêmica e por sua vez controle glicêmico. Está relacionado ao aumento da lipólise no tecido adiposo e aumento do gasto energético (Fisher FM, 2016). Estes efeitos estão associados diretamente com a diminuição da adiposidade e hepatoesteatose em animais obesos e diabéticos (Fisher FM, 2016).

Estudos demonstram também que o FGF21 age regulando a secreção de adiponectina do tecido adiposo, na promoção do *browning* de adipócitos, proteção vascular contra agentes inflamatórios e formação de placas ateroscleróticas (Babaknejad N, et al., 2018).

Níveis de FGF21 são aumentados durante o exercício físico basicamente em relação a sua intensidade e pós exercício os efeitos são se tornam mais evidentes e podem perdurar por até 4 horas em indivíduos saudáveis (Willis SA; et al., 2019).

O exercício físico agudo por exemplo também aumenta FGF21 circulante em indivíduos magros (Kim KH, et al., 2013), no entanto em humanos (Taniguchi H, et al., 2016, Yang SJ, et al., 2011) e roedores (Fletcher JA, et al., 2012) obesos, o exercício crônico diminui no plasma. O FGF21 tem sido proposto como um importante mediador dos efeitos pró-metabólicos do exercício físico (Loyd C, et al., 2016) e recentemente foi demonstrado que a melhora da resistência ao FGF21 no tecido adiposo de obesos está relacionado a esses efeitos metabólicos (Geng L, et al, 2019).

Avaliamos nos animais *adipoKO* a concentração de FGF21 circulante e observamos que diferente do mostrado anteriormente em animais *WT*, na ausência de adiponectina, FGF21 continua elevado (**Figura 7**). Portanto, a adiponectina parece ser necessária para os efeitos do exercício mediados por FGF21. De fato, FGF21 circulante aumenta a adiponectina do tecido adiposo subcutâneo, acompanhado de polarização de macrófagos M2, sugerindo que esse pode ser um mecanismo de defesa contra a sensibilidade à insulina e explicaria porque alguns indivíduos com sobrepeso não apresentam resistência à insulina (Li H, et al., 2018).

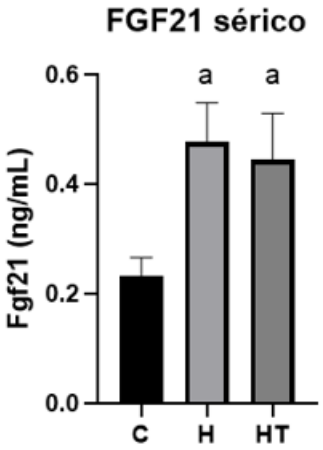

Figura 7. Efeito do exercício físico na concentração de FGF21 circulante de animais *adipoKO*. (a) (b) $p < 0,05$ por *One Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; média ± Desvio Padrão; (a) *versus* C e (b) *versus* H. n = 4-5. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

4.3. O exercício físico não diminui o acúmulo de lipídio hepático em animais adipoKO obesos

Como a diminuição de adiponectina na obesidade é um dos mecanismos relacionados à fisiopatologia da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), a prática de exercício físico é essencial no manejo do paciente com NAFLD (Thyfault JP; Rectore RS, 2020) também já foi demonstrado seu benefício em roedores obesos (Lavoie JM, 2005). Aqui fomos testar a hipótese se o exercício físico aeróbio exerce seus efeitos na diminuição da esteatose de maneira independente de adiponectina.

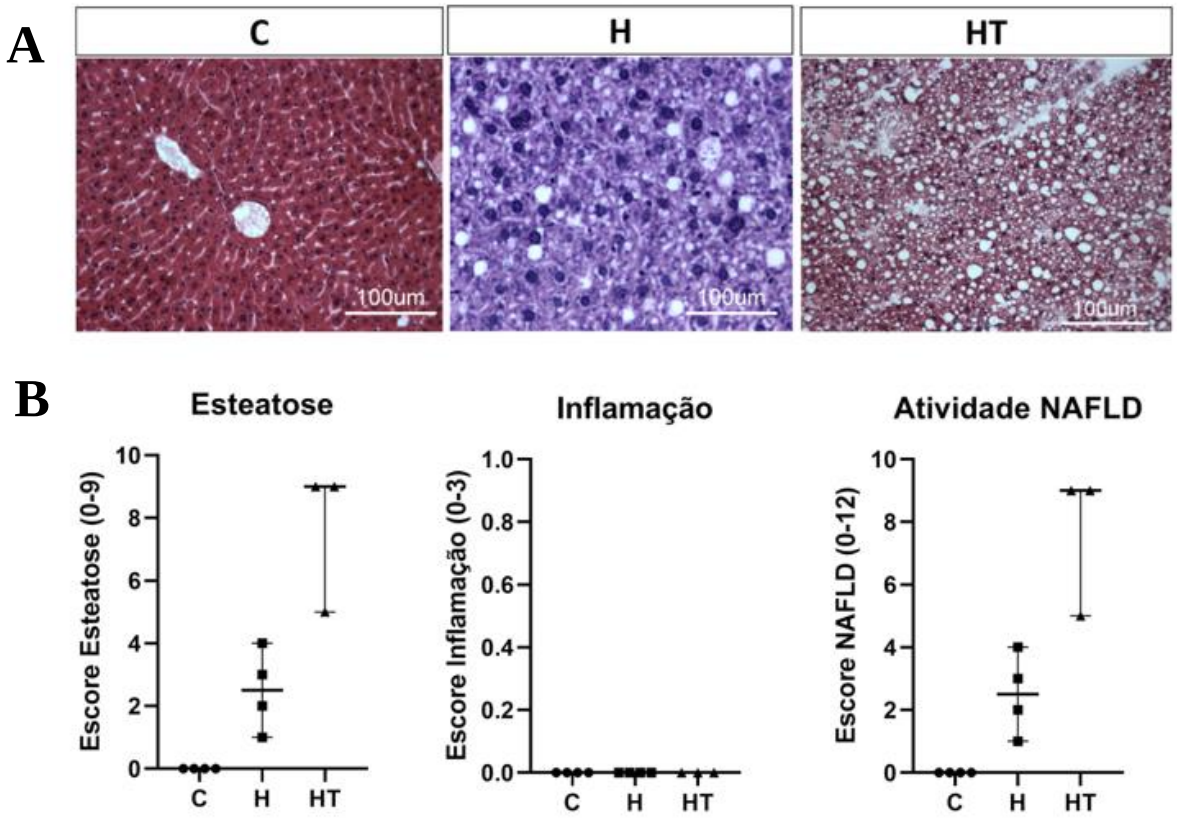

Figura 8. Acúmulo de gotas lipídicas no tecido hepático. (**A**) Fotomicrografias representativas de corte transversal de fígado corado com HE. *n* = 3; (**B**) Score de esteatose de acordo com Liang et al 2014.

Na **Figura 8** podemos observar que o exercício físico não melhora o quadro de esteatose hepática em animais *AdipoKO* obesos e apresentaram macroesteatose e microesteatose.

Evidências em humanos e roedores usando ferramentas *in vivo* e *in vitro* mostram que a obesidade e as dietas ricas em gordura, causas principais que impulsionam a esteatose, levam a aumentos compensatórios nas medidas da capacidade oxidativa e respiratória mitocondrial de hepatócitos, incluindo o fluxo do ciclo do ácido tricarboxílico, oxidação de ácidos graxos onde o fígado empacota e exporta TGs sistemicamente em VLDLs. (Satapati S, et al., 2015; Koliaki C, et al., 2015).

O exercício prepara o fígado para uma liberação excessiva de ácidos graxos livres. Rector RS, et al. (2008) demonstra que o exercício e as elevações na capacidade aeróbia intrínseca levam ao aumento da oxidação de ácidos graxos hepática, melhora da respiração mitocondrial e aumentos em outros resultados mitocondriais associados (atividade do citrato sintase, atividade β-Hidroxil-CoA Desidrogenase, conteúdo de citocromo C, etc.). Esses

aumentos nos marcadores da capacidade oxidativa hepática são retidos cronicamente no fígado. As adaptações mitocondriais hepáticas ao exercício são críticas porque uma alta oxidação de ácidos graxos livres hepática mais elevada é necessária para fornecer ATP para o caro processo de formação e liberação de energia da gliconeogênese (Morris EM, et al., 2014).

Como a adiponectina ao ligar no receptor adipoR2 induz a sinalização de PPARα, principal envolvido na oxidação de ácidos graxos esta via nos animais deste estudo está comprometida. O exercício também pode promover a restauração do quadro de esteatose independente da redução de peso corporal, mas através principalmente pela sensibilização da insulina, portanto, neste caso, a ausência da ativação da cascata adipoR2→AMPK→ PPARγ explicaria a não redução de gotas lipídicas (Thyfault JP; Rectore RS, 2020).

Como citado anteriormente avaliamos proteínas chaves dessa via Cpt1A e Pgc1a as quais têm como papel ativação de oxidação de lipídeos

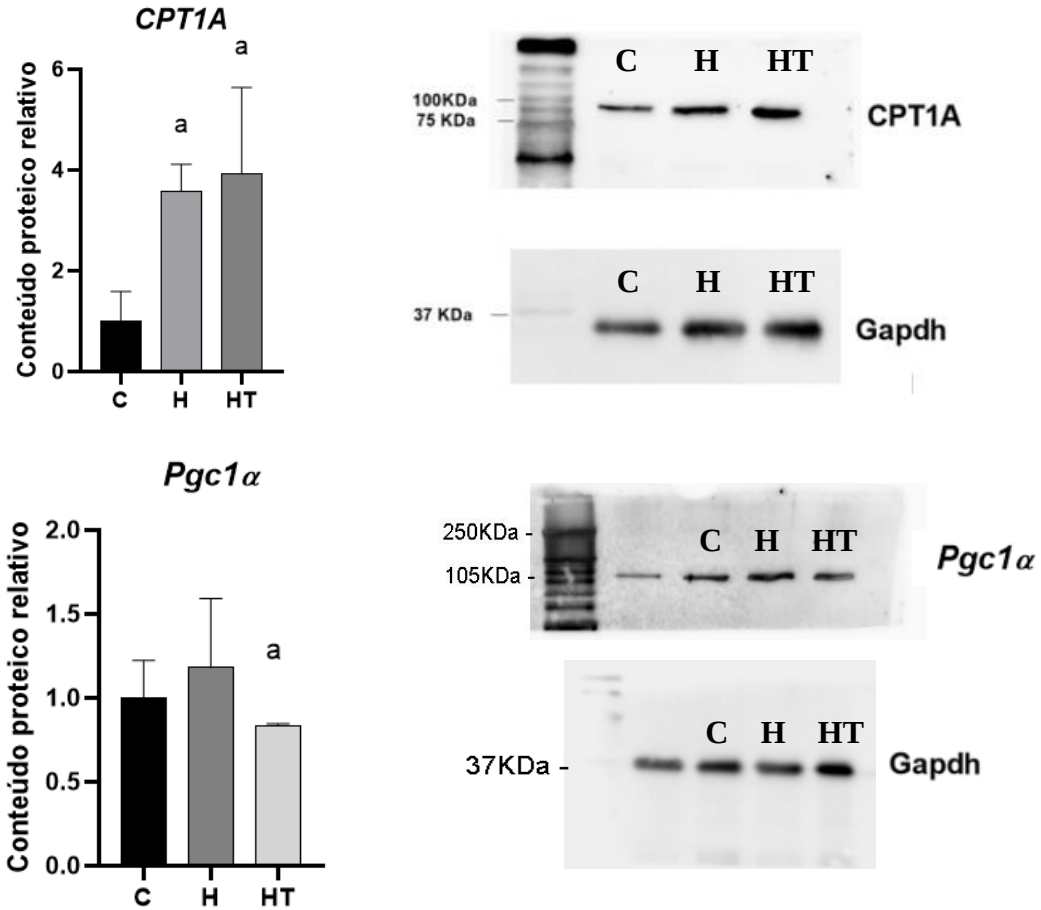

Figura 9. Expressão Proteica de Cpt1A e Pgc1α hepática. (a)(b) $p < 0,05$ por *One Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; média ± Desvio Padrão; (a) *versus* C e (b) *versus* H. *n* = 4-5 animais por grupo. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

Sabemos que o divisor de águas entre os eventos celulares que promovem a biogênese mitocondrial foi a descoberta de PGC-1α, um coativador induzível que regula a expressão de proteínas mitocondriais codificadas no núcleo e genomas mitocondriais (Lin et al., 2005). Uma característica fundamental dos coativadores PGC-1 é a alta versatilidade, pois interagem com muitos fatores de transcrição diferentes para ativar programas biológicos distintos em tecidos diferentes (Lin et al., 2005).

No esquelético músculo, PGC-1α emergiu como um regulador chave da biogênese mitocondrial que responde à entrada neuromuscular e a atividade contrátil predominante. Uma única sessão de exercícios de resistência induz um aumento rápido e sustentado no gene PGC-1α e proteína no músculo esquelético (Mathai et al., 2008), enquanto a superexpressão específica do músculo de PGC-1a resulta em um grande aumento nas mitocôndrias funcionais (Lin et al., 2002), melhorias no VO2máx de corpo inteiro, uma mudança de carboidrato para gordura combustíveis durante o exercício submáximo e melhor desempenho de resistência (Calvo et al., 2008). Estudos de ganho de função revelam que a expressão de PGC-1α em ou próximo a níveis fisiológicos leva à ativação de programas genéticos característicos de contração lenta fibras musculares (Lin et al., 2002), com os músculos desses camundongos transgênicos resistentes à fadiga induzida pela contração. Perda de estudos de função desafiam o requisito absoluto de PGC-1α para mudanças induzidas pelo treinamento de exercício no músculo mitocondrial biogênese, angiogênese e mudanças no tipo de fibra (Geng et al., 2010; Rowe et al., 2012).

Por isso, no somatório de funções, as observações atuais colocam PGC-1α como um jogador central na orquestração de muitos dos oxidativos adaptações ao exercício (Hawley et al., 2014). Sob condições normais de alimentação, PGC-1 é expresso em níveis muito baixos no fígado. No entanto, o jejum produz um aumento robusto da expressão de PGC-1, que, por sua vez, estimula gliconeogênese e metabolismo oxidativo de ácidos graxos (Liang H, 2006).

A AMPK fosforila PGC-1α em resíduos mais ativos. Estes resíduos de PGC-1α possuem um papel em regular fatores de transcrição e outras proteínas do metabolismo lipídico como por exemplo a indução de CPT1, ativada pelo fator de transcrição TRβ (Olesen J, 2010).

A β-oxidação do ácido graxo mitocondrial é a principal via para o catabolismo dos ácidos graxos e desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase energética de todo o corpo. A transferência de ácidos graxos para as mitocôndrias para oxidação ocorre de forma organizada e controlada. A família de enzimas que catalisam essa transferência é

chamada de L-carnitina acetiltransferases CPT1, estas enzimas catalisam a transferência de forma reversível de grupos acilas entre a coenzima A (CoA) e a L-carnitina, convertendo ésteres de acil-CoA em ésteres de acil-carnitina e vice-versa (Schlaepfer, IR; Joshi M, 2020).

No presente trabalho podemos identificar que a expressão proteica de CPT1A, a qual está associada também à ativação de PGC1α, foi aumentada em ambos os grupos H e HT. Como a expressão proteica de PCG-1α encontra-se reduzida pelo exercício físico podemos constatar uma relação inversa na cascata de ativação de CPT1A nos animais exercitados (Olesen J, 2010) uma vez que a ativação de CPT1A nos animais *AdipoKO* parece estar diretamente relacionada à indução pela dieta hiperlipídica, posto que, sua expressão foi aumentada independente de adiponectina e também, para outros efeitos, a não diferença na expressão de receptores adipoR2 mostrada adiante (**Figura 10**).

A partir destes resultados, fomos investigar qual o possível mecanismo hepático, também a partir do receptor de adiponectina e dos proliferadores de peroxissomas, está vinculado a não melhora da esteatose e intolerância à glicose.

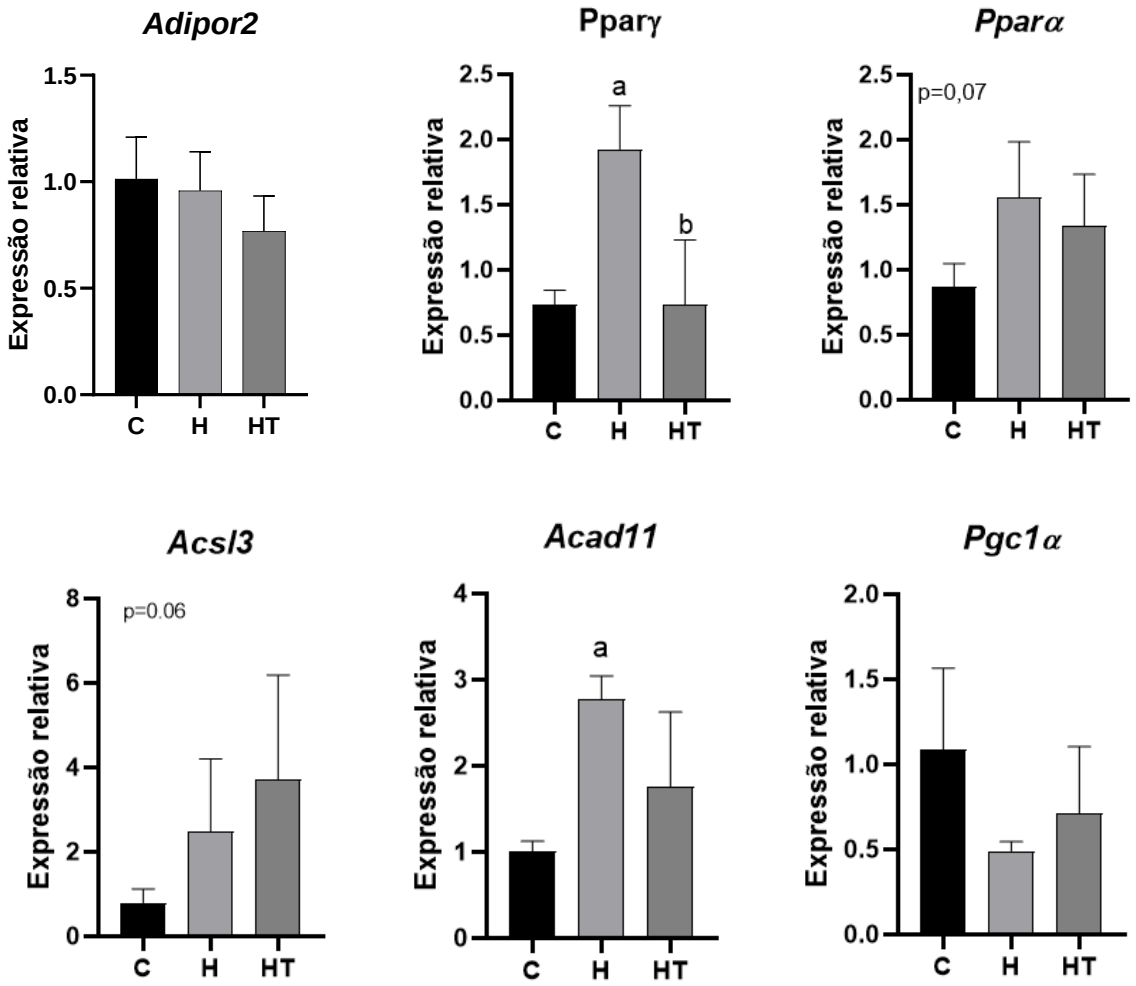

Figura 10. Efeito do exercício físico na expressão de genes relacionados a via de sinalização de adiponectina no fígado de animais *Adipoko.* (a)(b) $p < 0,05$ por *One Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; média ± Desvio Padrão; (a) *versus* C e (b) *versus* H. *n* = 4-5 animais por grupo. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

Um coativador de transcrição é definido como uma proteína ou complexo de proteínas que aumenta a probabilidade de um gene ser transcrito ao interagir com fatores de transcrição, mas não se liga ao DNA de uma maneira sequência-específica (Puigserver P, et al. 2003). Os PPARs (PPAR-α, PPAR-δ e PPAR-γ) são membros de uma família relativamente grande de receptores nucleares, todos estão sujeitos à coativação transcricional por PGC-1α. PPAR-α e PPAR-δ desempenham papéis mais importantes no controle da oxidação de ácidos graxos (van Raate DH, 2004). Enquanto que PPAR-γ é essencial para adipogênese e diferenciação (Lowel BB, 1999), o que explicaria o seu aumento expressivo nos grupos **H** e como o exercício físico promoveu sua inibição neste caso. Por esta razão também, PPAR-γ é o alvo de tiazolidinedionas

(TZDs), que são drogas que são amplamente utilizados para aumentar a sensibilidade à insulina em pacientes diabéticos (Rangwala SM; Lazar SM, 2004).

De maneira similar aos TZDs, Spiegelman BM e Flier JS (2001) demonstraram que os receptores de adiponectina podem ser regulados pelos agonistas de receptores nucleares de PPARα e PPARγ, desta forma, com a utilização de agonistas PPARα eles observaram a restauração da expressão adipoR1 e adipoR2 em tecido adiposo branco e marrom.

PPARγ também está fortemente relacionado ao armazenamento lipídico hepático, por isso foi investigado também genes associados a oxidação de ácidos graxos livres, Acad11 e Acsl3 (Liang H; Ward WF, 2006).

Ambos genes acetil-CoA sintetase de cadeia longa (Acsl3) e acetil-CoA Desisrogenase de cadeia curta (Acad11) são derivados do subproduto mitocondrial acetil-CoA (CH_3CO + coenzima A) que por sua vez são oriundos da vitamina B5 e cisteínas (Shi L; Tu BP, 2015). Estes genes estão associados à acetilação de proteínas, síntese de esteróides (triacilglicerol) e síntese e oxidação de ácidos graxos. Na maioria das células dos mamíferos, a acetil-CoA é predominantemente derivado da matriz mitocondrial através de vários circuitos metabólicos, como a glicólise, β-oxidação e o catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (Pietrocola F, et al.,2015).

Embora não tenha sido encontrada alterações na expressão do gene de Acsl3, foi observado maior expressão de Acad11 em nosso modelo nos animais do grupo obeso em relação ao grupo Controle. Embora haja diferença de quantidade da família de Acil-CoA sintetases de cadeia longa encontrada nos tecidos entre suas subunidades, em animais, os ácidos graxos predominantes são justamente os de cadeia longas, sendo assim o processo de acilação se dá em maioria pela acetil-CoA de cadeia longa (ACSL). Uma possível explicação para a superexpressão de Acsl3 encontrada no grupo obeso deste trabalho é que, após a entrada de ácidos graxos na célula e transformação em ACSLs, os mesmos atuam na regulação transcricional de PPARs (α, γ e δ), corroborando com a alta expressão de PPARγ no mesmo tecido (Teodoro BG, 2016).

4.4 O exercício físico não induz hipertrofia no músculo esquelético de animais adipoKO obesos

No presente estudo observamos um aumento da área de secção transversa das fibras musculares do músculo sóleo de animais AdipoKO em animais obesos sedentários e treinados (**Figura 11**). Esse resultado juntamente com o peso muscular, não indicam que o treinamento aeróbio foi capaz de hipertrofia o músculo.

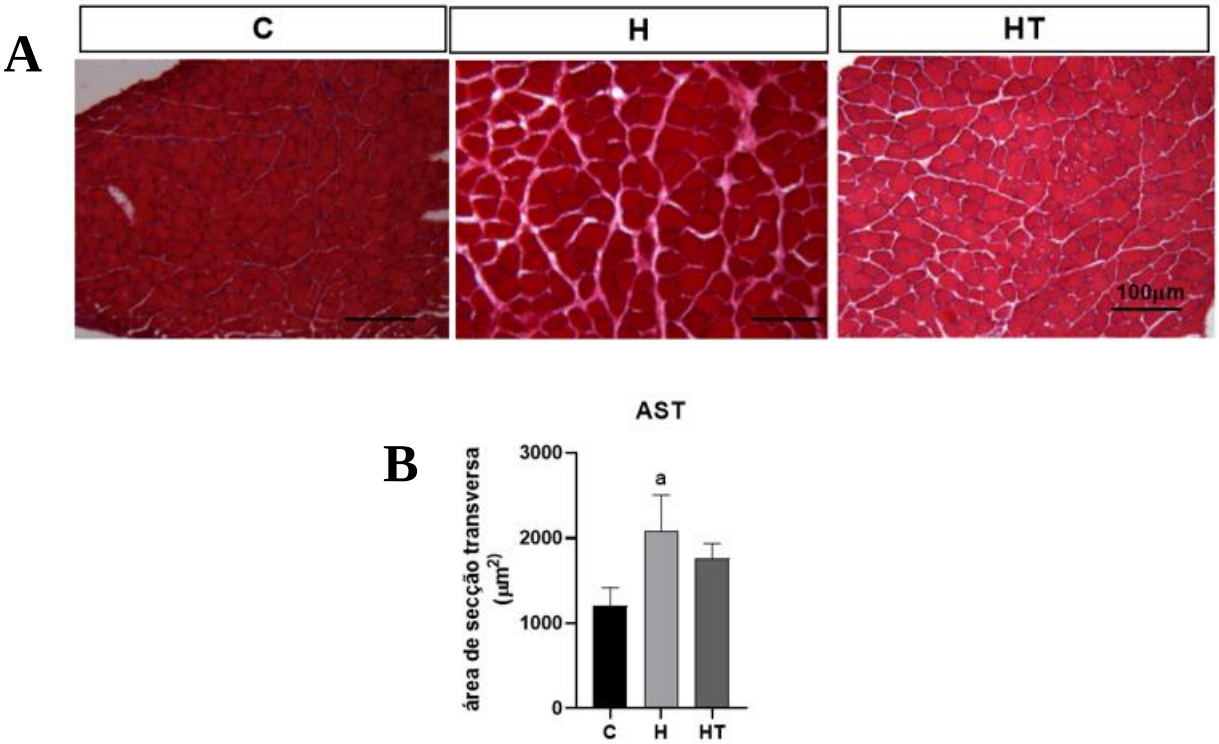

Figura 11. Área da secção transversa das fibras musculares. (**A**) Fotomicrografias representativas de corte transversal de músculo sóleo corado com HE, aumento de 130X. (**B**) Área da Secção Transversa do músculo Sóleo. (a) $p < 0,05$ vs C. Análise multivariada *One-way ANOVA*. Valores representam média ± Desvio Padrão. n = 3. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

Em nosso estudo não observamos aumento de peso ou aumento na área de secção transversa induzido por exercício físico na ausência de adiponectina, sugerindo que a adiponectina pode ter uma participação na hipertrofia mediada por exercício físico. Portanto, exercício físico do tipo aeróbio não hipertrofia músculo sóleo em camundongos *AdipoKO*.

Em animais diabéticos db/db, treinamento crônico em esteira melhorou intolerância à glicose e capacidade de exercício, reduzindo marcadores de degradação e aumento moderado

do peso muscular, sugerindo que em partes o aumento de síntese proteica está relacionado ao aumento do peso muscular de animais db/db (Ostler et al., 2014).

O músculo esquelético é um tecido altamente responsivo, ao menor sinal de estímulo, ele é capaz de ajustar seu fenótipo para se adequar às alterações metabólicas necessárias (Franchi MV, 2017), um desses ajustes é a hipertrofia. Após uma sessão de exercício as fibras musculares são rompidas e têm como uma de suas principais células aliadas para ajudar no processo de reparação, as células satélites. Este processo chamado de miogênese está presente na presença de agente inflamatórios, porém há controvérsias quanto a sua participação no mecanismo de hipertrofia muscular (Murach KA, 2018). Alguns estudos sustentam um importante papel das células satélites durante o processo de hipertrofia (Egner IM, 2016), enquanto outras pesquisas apontam para processos hipertróficos mesmo na ausência destas células especializadas (McCarthy JJ, 2011).

Entretanto, sabe-se que, o metabolismo e as propriedades contráteis do músculo esquelético são dependentes do turnover proteico miofibriliar e mitocondrial (Groennebaek, et al, 2017). No caso do protocolo de exercício físico realizado neste estudo ser considerado crônico e o músculo em questão ser em grande parte postural e ter propriedades oxidativas relevantes, como por exemplo o maior número mitocondrial, sugere-se que o aumento do tamanho da célula muscular pode ter sido foi em partes devido ao aumento de seu metabolismo.

Como PGC-1 α, é abundantemente expresso no músculo esquelético e parece desempenhar um papel na resposta adaptativa ao exercício como demonstrada mais adiante neste trabalho (**Figura 13)**, principalmente no contexto do treinamento de resistência (Ruas JL, et al., 2012). A tradução proteica do gene PGC-1α ativa a expressão de IGF-1 (*insulin growth fator*) enquanto suprime concomitantemente as vias da miostatina, um inibidor da diferenciação e crescimento das células musculares (Ruas JL, et al., 2012).

Ruas JL, et al., (2012), ainda identifica que após um treinamento de *endurance* (resistência), exercício resistido ou uma combinação dos dois, os aumentos em PGC-1α foram confinados apenas a exercícios de *endurance* ou o exercício combinado (*endurance* + resistido).

Embora esses resultados sejam notáveis, a proposta de que a hipertrofia do músculo esquelético após exercício de resistência é mediada por PGC-1α permanece em debate.

4.4 O exercício físico não reduz acúmulo de lipídeos no músculo esquelético de animais adipoKO obesos

A obesidade induz resistência à insulina no músculo esquelético principalmente por promover maior acúmulo intramiocelular de lipídios, o qual é o maior defeito envolvido no desenvolvimento de diabetes tipo 2, afetando a sensibilidade à insulina (DeFronzo RA, 2009).

Avaliamos o efeito do exercício físico no acúmulo de lipídeos no músculo esquelético dos animais *AdipoKO* obesos sedentários e treinados. O consumo de dieta hiperlipídica aumentou a marcação de lipídios no músculo sóleo e de modo interessante, nos animais treinado não houve redução da quantidade de lipídios pelo exercício físico (**Figura 13**).

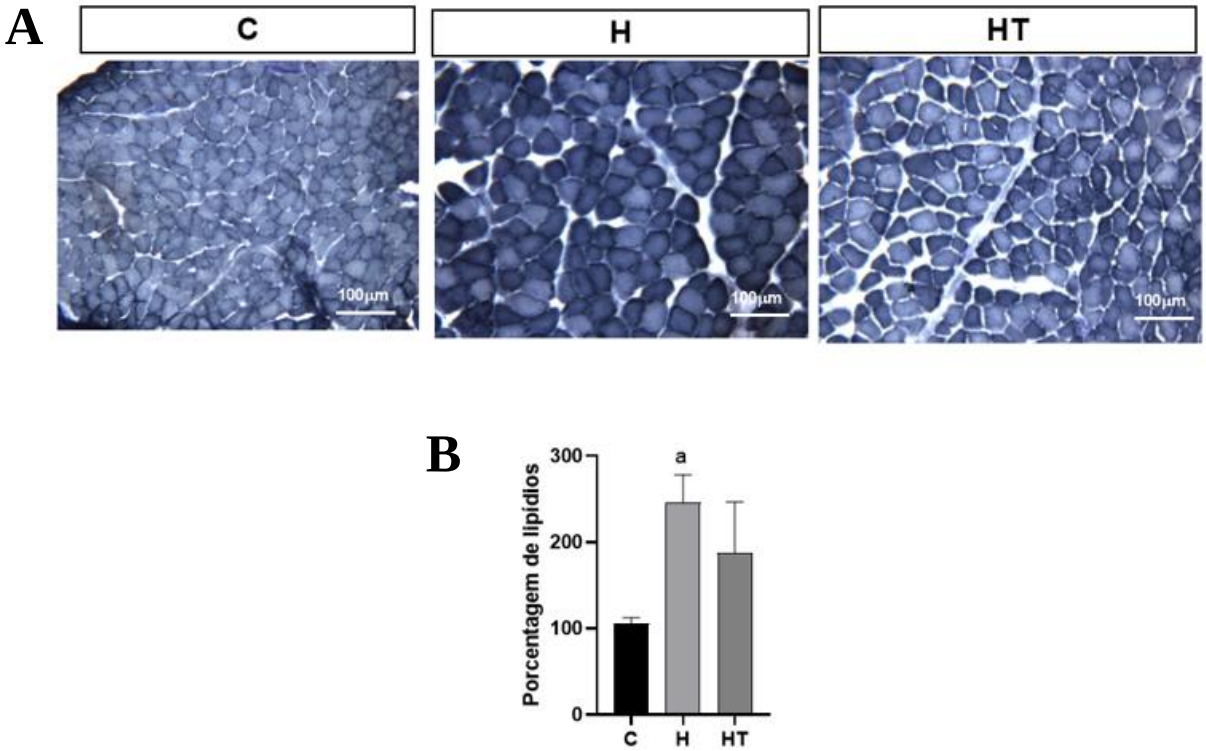

Figura 12. Marcação histológica de triglicerídeos no tecido muscular. (**A**) Fotomicrografias representativas de corte transversal do músculo sóleo coradas com Sudan Black. Objetiva de 10x (130x). (**B**) Quantidade de Lipídeos marcados por Sudan Black avaliados em escala de cinza. (a) $p < 0,05$ vs C. Análise multivariada *One-way ANOVA*. Valores representam média ± D.P., n=5. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

O exercício físico não foi capaz de reduzir acúmulo de gordura intramiocelular nos animais obesos *AdipoKO*. De acordo com a via da adiponectina através do receptor adipoR1, a melhora da sensibilização à insulina pode promover lipólise e consequentemente mais quebra de ácidos graxos para a corrente sanguínea, porém estes efeitos estão mais associados ao tecido adiposo, o tecido muscular não respondeu de forma a reduzir os grupamentos de TG, talvez justamente pela da não ativação da via da adiponectina, haja visto que seus receptores não foram superexpressos, permaneceram em mesmo nível que o grupo controle (**Figura 13**).

No músculo sóleo avaliamos a expressão gênica de elementos chaves da via da adiponectina, adipoR1, Pcg1a e Cpt1b.

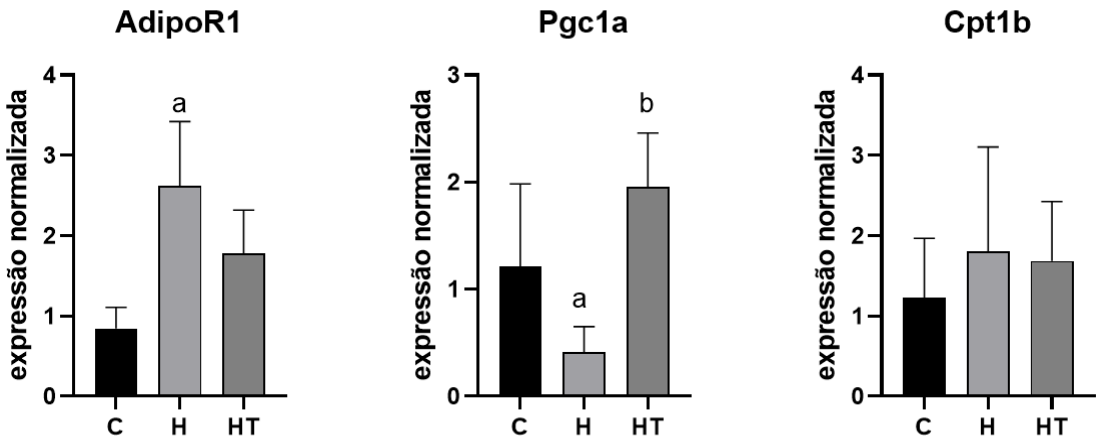

Figura 13. Efeito do treinamento aeróbio na modulação da via de sinalização do adipoR1. (a)(b) $p < 0,05$ por *One Way* ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; média ± Desvio Padrão; (a) *versus* C e (b) *versus* H. n = 4-5 animais por grupo. C, controle; H, alimentado com dieta hiperlipídica e HT, alimentado com dieta hiperlipídica e treinado.

Observamos que animais obesos tiveram maior expressão do receptor AdipoR1, enquanto que para os animais obeso exercitado não ocorreu diferença significativa na expressão dos receptores em relação ao grupo controle. Acredita-se em maior mobilização de fatores de transcrição e proteínas da via oxidativa para aumentar o número de receptores de membrana sugerindo algum mecanismo compensatório nos animais obesos, visto que não expressam adiponectina, agonista do receptor.

De acordo com a menor estimulação da via do AdipoR1, animais obesos *AdipoKO* tiveram menor expressão de PCG-1α no músculo sóleo, cuja expressão foi revertida pelo treinamento aeróbio. Esse resultado, mostra que provavelmente por mecanismo independente

de adipoR1, o exercício é capaz de estimular a transcrição de PCG-1α e assim a biogênese mitocondrial.

Já em relação a expressão de CPT1b, um marcador de oxidação de ácidos graxos, de acordo com a falta de adiponectina, não houve diferença na expressão desse transcrito em animais *AdipoKO* obesos sedentários e treinados. Similar o que ocorre no fígado (**Figura 9**), esta enzima parece desempenhar papel independente das alterações de PCG-1α.

Os dados de expressão gênica juntamente com a marcação de lipídeos sugerem que a adiponectina é importante para os efeitos do exercício aeróbio na redução de lipídios ectópicos no músculo. No entanto, por vias independentes de AdipoR1, é capaz de estimular a biogênese mitocondrial, indicada indiretamente pela expressão de Pgc1a. Como apontado na **Figura 6**, a sensibilidade à insulina sistêmica melhora nesses animais indicando que a sensibilidade à insulina no músculo esquelético também é afetada da mesma forma.

5 CONCLUSÃO

O protocolo de exercício físico para os animais *WT* aumenta os níveis de adiponectina sérica e para os animais A*dipoKO* restaura a sensibilidade à insulina à nível de controle, porém não reverte à intolerância à glicose. A participação hepática da produção de glicose parece pouco ou não responder ao treinamento, bem como a expressão gênica do receptor adipoR2.

A ausência de adiponectina para captação de glicose também parece afetar FGF21, uma vez que o exercício não altera níveis séricos em relação à obesidade.

Expressões de PGC-1α e PPARα não sofreram alterações no tecido hepático, apenas PPARγ, corrobora fortemente com a literatura como ativador da oxidação lipídica hepática, demonstrou alteração não dependente de adiponectina sendo restaurado à níveis controle pelo exercício.

Histologicamente podemos concluir que a ausência de adiponectina pode atrapalhar a atuação do exercício físico em ativar PPARα via adipoR2 e em sua possível contribuição na oxidação de ácidos graxos via genes que participam da regulação glicolítica no fígado, talvez por isso não se observa melhora no quadro de esteatose hepática. Assim como no fígado, embora PGC1α tenha sido superexpresso pelo exercício físico, o excesso lipídico intramuscular não é revertido pelo exercício e também a área de secção transversa das fibras musculares não são hipertrofiadas.

Em suma, conclui-se que a adiponectina possui um papel consistente na sensibilização da insulina como demonstrado por este estudo e extremamente relevante para o metabolismo glicolítico e para o metabolismo oxidativo; e embora ocorra a redução o peso corporal, o protocolo de exercício físico aeróbio não sustentou efeitos significativos glicolíticos no fígado e na redução de lipídeos nos tecidos hepático e muscular na ausência de adiponectina.

REFERÊNCIAS*

Andrews P, Johnson RJ. Evolutionary basis for the human diet: consequences for human health. Journal of Internal Medicine. 2020; 287:226-237.

Aguilar-Salinas CA, et al. High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. J Clin Endocrinol Metab. 2008; Oct;93(10):4075-9.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 257:79–83.

Augusto V, Padovani CR, Campos, GER. Skeletal muscle fiber types in C56Bl6J mice. Braz. J. morphol. Sci. 2004; 21(2), 89-94.

Barnard Alan J. Hunter-gatherers in history, archaeology, and anthropology. NY, Berg Publishers, 2004.

Babaknejad, N., Nayeri, H., Hemmati, R., Bahrami, S. & Esmaillzadeh, A. An overview of FGF19 and FGF21: the therapeutic role in the treatment of the metabolic disorders and obesity. Horm. Metab. Res. 2018; 50, 441–452

Beaulieu K, Hopkins M, Blundell J, Finlayson G. Does Habitual Physical Activity Increase the Sensitivity of the Appetite Control System? A Systematic Review. Sports Med. 2016; Dec;46(12):1897-1919.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem.1976 7(72):248-254.

Bramble DM, Lieberman DE. Endurance running and the evolution of Homo. Nature, 2004; 432(7015), 345–352.

Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. World J Gastroenterol. 2011; 21;17(23):2801-11.

Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Metabolism. 2016; Aug;65(8):1038-48.

Calvo JA, et al. Muscle-specific expression of PPAR{gamma} coactivator-1{alpha} improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. J Appl Physiol. 2008;104(5):1304–1312.

Cho JK, et al. Exercise Training Improves Whole Body Insulin Resistance via Adiponectin Receptor 1. Int J Sports Med. 2015.

*De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.hmtl

Cornelissen VA, Smart NA. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. J Am Heart Assoc. 2013; 1;2(1):e004473.

DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. Diabetes Care 2009; 32: S157–S163.

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. Nature. 2006 444:881-887.

Donnelly JE, Hillman CH, Castelli D, Etnier JL, Lee S, Tomporowski P, Lambourne K, Szabo-Reed AN. Physical Activity, Fitness, Cognitive Function, and Academic Achievement in Children: A Systematic Review. Med Sci Sports Exerc. 2016 Jun;48(6):1197-222.

Dyck, David J. Leptin Sensitivity in Skeletal Muscle Is Modulated by Diet and Exercise, Exercise and Sport Sciences Reviews: October 2005; 33(4):189-194.

Egner IM, Bruusgaard JC, Gundersen K. Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. Development. 2016 Aug 15;143(16):2898-906. doi: 10.1242/dev.134411.

Eknoyan, G. A History of Obesity, or How What Was Good Became Ugly and Then Bad. Advances in Chronic Kidney Disease, 2006; 13(4), 421–427.

Esfahani M, et al. Adiponectin: an adipokine with protective features against metabolic syndrome. Iran J Basic Med Sci. 2015; 18(5):430-42.

Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. Cell. 2015; 36(7):461-70.

Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. J. Clin. Invest. 2006 116:615-622.

Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21. Annu. Rev. Physiol. 2016; 78, 223–241.

Flecher JA. Modulating fibroblast growth factor 21 in hyperphagic OLETF rats with daily exercise and caloric restriction Applied Physiology Nutrition and Metabolism August 2012 37(6).

Flegal KM, et al. Cause-especific excess deaths associated with underweight, overweight and obesity. JAMA. 2007; 298:17, 2028-37.

Fogel RW: The Escape from Hunger and Premature Death, 1700-2100. Cambridge, UK, Cambridge University Press, 2004.

Fotbolcu H, Zorlu E. Nonalcoholic fatty liver disease as a multi-systemic disease. World J Gastroenterol. 2016 Apr; 28;22(16):4079-90.

*De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.hmtl

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972.

Frontera, WR, Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. Calcified Tissue International. 2015; 96(3), 183–195.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. Mol Cell Endocrinol. 2010 Mar; 25;316(2):129-39.

Geng L, et al. Exercise Alleviates Obesity-Induced Metabolic Dysfunction via Enhancing FGF21 Sensitivity in Adipose Tissues. Cell Reports. 2019; 26:2738-2752.

Geng T, et al. PGC-1 plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle AJP Cell Physiology March 2010; 298(3):C572-9.

Groennebaek T., Vissing K. Impact of resistance training on skeletal muscle mitochondrial biogenesis, content, and function. Front. Physiol. 2017; 8:713.

Gonzalez AB, et al. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. N Engl J Med. 2010; 363:2211-2219.

Goodyear LJ, Kahn BB. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. Annu Rev Med. 1998; 49:235-61.

Handschin C,Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1a in inflammation and chronic disease. Nature. 2008; 454:463-469.

Harari YN. Sapiens – Uma Breve História da Humanidade. Editora L&PM, 2015.

Hawley JA,Hargreaves M,Joyner MJ,Zierath JR. Integrative biology of exercise. Cell. 2014; 159(4):738-49.

Heilbronn LK, Campbell LV, Xu A, Samocha-Bonet D. Metabolically protective cytokines adiponectin and fibroblast growth factor-21 are increased by acute overfeeding in healthy humans. PLoS One. 2013 Oct; 18;8(10):e78864.

Himms-Hagen J, Harper ME. Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. Exp Biol Med. 2001; 226:78-84.

Høydal MA, et al. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2007; 14:753–760.

*De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.hmtl

Iyer A, et al. Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. Nat Rev Endocrnol. 2010; 6(2):71-82.

Iwabu M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1α nd mitochondrial by Ca^{+2} and AMPK/SIRT1. Nature. 2010; v464.

Iwabu M, et al. Adiponectin receptor-target therapy for lifestyle-related diseases. Clin Calcium. 2016; 26(3):413-8.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. J Clin Invest. 2006

Kim KH, et al. Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. Nat Med. 2013 Jan;19(1):83-92.

Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. Cell Metab 2015;21:739–746.

Koves TR, et al. PPAR gamma coactivator 1alpha contributes to exercise-induced regulation of intramuscular lipid droplet programming in mice and humans. Journal Lipid Res. 2013; 54:522–34.

Li H, et al. Fibroblast growth factor 21 increases insulin sensitivity through specific expansion of subcutaneous fat. Nature Communications. 2018; 272.

Li S, et al. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. JAMA: the journal of the American Medical Association. 2009; 302:179–188.

Liang H,Ward WF. PGC-1 : a key regulator of energy metabolism. AJP: Advances in Physiology Education, 2006; 30(4), 145–151.

Lin Z, Tian H, Lam KS, Lin S, Hoo RC, Konishi M, Itoh N, Wang Y, Bornstein SR, Xu A, Li X. Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. Cell Metab. 2013 May; 7;17(5):779-89.

Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. Cell Metabolism. June 2005; 1:361-370.

Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. J. Biol. Chem. 2002; 277, 1645–1648.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.

*De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.hmtl

Lowell BB. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. Cell 1999; 99: 239 –242.

Loyd, C. et al. Fibroblast growth factor 21 is required for beneficial effects of exercise during chronic high-fat feeding. J of Appl. Phys. 2016; 121(3), 687–698.

Luciano E, et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. European Journal of Endocrinology. 2002; 147:149-157.

Ma JF, et al. Genotypic Difference in Silicon Uptake and Expression of Silicon Transporter Genes in Rice, Plant Physiology 2007; 145(3).

McCarthy JJ, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, Srikuea R, Lawson BA, Grimes B, Keller C, Van Zant G, Campbell KS, Esser KA, Dupont-Versteegden EE, Peterson CA. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. Development. 2011; Sep;138(17):3657-66.

Mao X, et al. APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. Nat Cell Biol.2006; 8(5):516-23.

Masi LN, Martins AR, Rosa Neto JC, do Amaral CL, Crisma AR, Vinolo MA, de Lima Júnior EA, Hirabara SM, Curi R. Sunflower oil supplementation has proinflammatory effects and does not reverse insulin resistance in obesity induced by high-fat diet in C57BL/6 mice. J Biomed Biotechnol. 2012.

Mathai AS, Bonen A, Benton CR, Robinson DL, Graham TE. Rapid exercise-induced changes in PGC-1α mRNA and protein in human skeletal muscle. J Appl Physiol. 2008;105:1098–1105.

Mendonça M, de Sousa É, da Paixão AO, Araújo Dos Santos B, Roveratti Spagnol A, Murata GM, Araújo HN, Imamura de Lima T, Passos Simões Fróes Guimarães DS, Silveira LR, Rodrigues AC. MicroRNA miR-222 mediates pioglitazone beneficial effects on skeletal muscle of diet-induced obese mice. Mol Cell Endocrinol. 2020 Feb; 5;501:110661.

Ministério da Saúde. Assuntos Obesidade. Notícias. Publicado em 04/03/2020 Brasília, DF: OMS/DATASUS Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/mais-da-metade-dos-brasileiros-esta-acima-do-peso

Morris EM, Jackman MR, Johnson GC, et al. Intrinsic aerobic capacity impacts susceptibility to acute high-fat diet-induced hepatic steatosis. Am J Physiol Endocrinol Metab 2014;307:E355–E364.

*De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.hmtl

Murach KA, Fry CS, Kirby TJ, Jackson JR, Lee JD, White SH, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Starring or Supporting Role? Satellite Cells and Skeletal Muscle Fiber Size Regulation. Physiology (Bethesda). 2018 Jan 1;33(1):26-38.

Murphy, Robyn M.; Watt, Matthew J.; Febbraio, Mark A. Metabolic communication during exercise. Nature Metabolism. 2020.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, et al. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. J. Biochem. 1996; 120, 803-812

Nigro E, et al. New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. BioMed Research International. 2014.

Okada-Iwabu M, et al. Perspective of Small-Molecule AdipoR Agonist for Type 2 Diabetes and Short Life in Obesity.Diabetes Metab J. 2015; 39(5)5:363-72.

Olesen J, Kiilerich K, Pilegaard H. PGC-1alpha-mediated adaptations in skeletal muscle. Pflugers Arch. 2010; 460(1):153-62.

Ostler JE, et al. Effects of insulin resistance on skeletal muscle growth and exercise capacity in type 2 diabetic mouse models Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014; Mar 15; 306(6): E592–E605

Otabe S, et al. Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. American journal of physiology.Endocrinology and metabolism. 2007; 293(1):210–8.

Pedersen BK, et al. Evidences for prescribing exercise as therapy in chronic disease. Scand J Med Sci Sports. 2006; 16(3):63.

Pietrocola F, et al. Acetyl Coenzyme A: A Central Metabolite and Second Messenger Cell Metabolism. 2015; 21(6).

Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. Diabetes Obes Metab. 2010 May;12(5):365-83.

Puigserver P and Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev 2003; 24: 78 –90.

Rangwala SM and Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. Trends Pharmacol Sci 2004; 25: 331– 336.

*De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.hmtl

Rasbach KA, et al. PGC-1alpha regulates a HIF2alpha-dependent switch in skeletal muscle fiber types. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(4):21866-71.

Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. World J Gastroenterol 2008;14:185–192.

Richter EA,Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake.Physiol Rev.2013; 93(3):993-1017.

Rowe GC, Jang, C, Patten IS, Arany Z. PGC-1beta regulates angiogenesis in skeletal muscle. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2011; 301, E155–E163.

Ruas JL, et al. A PGC-1a isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. Cell 2012; 151, 1319–1331.

Satapati S, Kucejova B, Duarte JA, et al. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. J Clin Invest 2015;125:4447–4462.

Scherer PE, Williams S, Fogliano, M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J. Biol. Chem. 1995; 270, 26746-26749.

Shi L,Tu BP. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. Curr. Opin. Cell Biol. 2015; 33: 125-131.

Schlaepfer IR, Joshi M. CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. Endocrinology. 2020 Feb 1;161(2):bqz046.

Schrauwen P, Saris WH, and Hesselink MK. An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. FASEB J. 2001 15(13):2497-502.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. Nature. 2000 Apr; 6;404(6778):661-71.

Shortreed KE, et al. Muscle-specific adaptations, impaired oxidative capacity and maintenance of contractile function characterize diet-induced obese mouse skeletal muscle. PLoS One, 2009; 4(10), e7293.

Singh P, Sharma P, Sahakyan KR, Davison DE, Sert-Kuniyoshi FH, Romero-Corral A, Swain JM, Jensen MD, Lopez-Jimenez F, Kara T, Somers VK. Differential effects of leptin on adiponectin expression with weight gain versus obesity. Int J Obes (Lond). 2016 Feb;40(2):266-74.

Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. Adv Physiol Educ. 2014; 38:308–314.

*De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.hmtl

Stiegler P, Cunliffe A. The role of diet and exercise for the maintenance of fat-free mass and resting metabolic rate during weight loss. Sports Med 2006; 36:239–262.

Taniguchi, H., K. Tanisawa, X. Sun, T. Kubo, and M. Higuchi. Endurance exercise reduces hepatic fat content and serum fibroblast growth factor 21 levels in elderly men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2016; 101:191–198.

Teodoro BG.

Thyfault JP, Rector RS. Exercise Combats Hepatic Steatosis: Potential Mechanisms and Clinical Implications. Diabetes. 2020;69(4):517-524.

Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. J Biol Chem. 2004; 279:30817-822.
van Raalte DH, Li M, Pritchard PH, and Wasan KM. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. Pharm Res. 2004; 21: 1531–1538.

Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. Journal of Molecular Cell Biology, 2016; 8(2), 93–100.

Willis, S. A. et al. Efect of exercise intensity on circulating hepatokine concentrations in healthy men. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2019; 44, 1065–1072.

Wernstedt-Asterholm I, et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. Cell Metab. 2014; 20:1, p.103-18.

World Health Organization. Health topics. Obesity - Overview, Complications, Prevention and Control – Disponível em: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1

Yanai H, Yoshida H. Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives. Int J Mol Sci. 2019; Mar 8;20(5):1190.

Yang SJ, et al. Serum Selenoprotein P Levels in Patients with Type 2 Diabetes and Prediabetes: Implications for Insulin Resistance, Inflammation, and Atherosclerosis, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, August 2011; 96(8):1325–1329.

Yamauchi T, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature medicine. 2002; 8(11):1288-95.

Yamauchi T, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature. 2003; 423(6941):762-9.

*De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.hmtl

Zurlo F, Larson K, Bogardus C, Ravussin E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. J Clin Invest. 1990; Nov;86(5):1423-7

*De acordo com: International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.hmtl