

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCIANA COSTA MELO

**Exercício físico de baixa intensidade como estratégia protetora contra a doença hepática gordurosa não alcoólica associada à síndrome metabólica em um modelo murino-dietético**

Maceió

2018

LUCIANA COSTA MELO

**Exercício físico de baixa intensidade como estratégia protetora contra a doença hepática gordurosa não alcoólica associada à síndrome metabólica em um modelo murino-dietético**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em ciências da saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luiza Antas Rabêlo

Maceió

2018

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

- M528e Melo, Luciana Costa.  
Exercício físico de baixa intensidade como estratégia protetora contra a doença hepática gordurosa não alcoólica associada à síndrome metabólica em um modelo murino- dietético / Luciana Costa Melo. – 2019.  
104 f.: il. color.
- Orientadora: Luiza Antas Rabêlo.  
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal De Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2018.
- Bibliografia: f. 80-91.  
Apêndices: f. 92-103.  
Anexo: f. 104.
1. Hepatologia gordurosa não alcoólica. 2. Síndrome metabólica.  
3. Camundongos. 4. Natação - Exercícios físicos. 5. Exercícios físicos aquáticos. I.  
Título.

CDU: 616.36:797.2



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária - Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppgcs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

## Folha de Aprovação

Luciana Costa Melo

Exercício físico de baixa intensidade como estratégia protetora contra a doença hepática gordurosa não alcoólica associada à síndrome metabólica em um modelo murino-dietético

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 21 de Dezembro de 2018.

## Banca Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araújo - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Fabiana Andrea Moura - (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Valéria Nunes de Souza - (UFPE)

Dedico esta tese à minha família que constitui as raízes necessárias para a minha fortaleza e me dá liberdade para alçar voos tão grandes quanto as minhas vontades

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) por proverem o curso de doutorado;

Ao Max Delbrück Center for Molecular Medicine pelo apoio técnico, científico e financeiro, viabilizando os experimentos desta tese e publicações oriundas desse trabalho;

Ao Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC), onde esta tese foi desenvolvida, por contribuir para minha formação técnica, científica, profissional e humana, além de fornecer estrutura para a realização dos experimentos e desenvolvimento desta tese;

Ao Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL, em nome da Professora Teresinha de Jesus Calado, por disponibilizar espaço físico e equipamentos para o processamento histológico das amostras;

Ao Laboratório de Biologia Celular da UFAL, por disponibilizar espaço físico e equipamentos para análise histológica;

À Profa. Dra. Luiza Antas Rabêlo, orientadora desta tese, pela oportunidade de integrar o LRC abrindo-me o mundo da pesquisa experimental, pelo compartilhamento de saberes, pela orientação dessa tese e pela contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal;

Ao Prof. Dr. Michael Bader por conceder apoio técnico, científico e financeiro para o desenvolvimento dessa tese e pela contribuição intelectual para a divulgação científica dos trabalhos oriundos dessa tese;

À Profa. Dra. Valéria Nunes de Souza pela colaboração técnica e científica na realização dos experimentos;

Ao Me. Carlos Eduardo Menezes Silva pela colaboração no aperfeiçoamento do sistema de natação e condução dos experimentos in vivo;

À Luana Castro, à época estagiária científica do LRC, pela colaboração durante a condução do experimento de natação;

Aos discentes do LRC durante o período de 2014 a 2018 que contribuíram direta e indiretamente para que esta tese fosse desenvolvida;

A todos os professores que fizeram parte da minha vida escolar e acadêmica por terem acreditado e por me fazer acreditar em minha capacidade. Por serem exemplo de que a docência é uma carreira que vale a pena;

À minha família, por financiar a minha permanência no doutorado, por todo apoio, por toda dedicação, por todo amor;

Aos amigos que conquistei durante a vida pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis e por compartilharem a minha felicidade;

A Deus.

## RESUMO

O termo doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) refere-se a um amplo espectro de danos hepáticos decorrentes do acúmulo de lipídios no fígado. Propõe-se a existência de dois tipos de DHGNA: (1) associada à SMet e (2) independente da SMet. Nesse contexto, recomenda-se o exercício de moderada ou alta intensidade como estratégia para o tratamento das disfunções metabólicas, dentre elas a DHGNA. No entanto, tais exercícios induzem estresse metabólico e cardiovascular. Diante disso, o trabalho teve como objetivo a investigação dos efeitos hepáticos e sistêmicos de um protocolo de exercício de baixa intensidade na modalidade natação em um modelo murino-dietético de DHGNA associada à SMet. Para tanto, utilizou-se camundongos C57Bl/6 submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica (58,4 % de quilocalorias provenientes de lipídios) ou à dieta padrão (14 % de quilocalorias provenientes de lipídios). Após sete semanas de intervenção dietética, instituiu-se os grupos natação em que os animais foram submetidos a um protocolo exercício de baixa intensidade por quatro semanas. O protocolo de natação foi composto por 2 sessões de 90 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 4 semanas. Os resultados apontaram que a dieta foi eficiente para estabelecer o fenótipo DHGNA associada à síndrome metabólica em camundongos C57BL/6 com aumento de tecido adiposo branco, intolerância à glicose, redução da sensibilidade a insulina, dislipidemia e esteatose hepática. O protocolo de natação reverteu tais disfunções. A regularização dos níveis plasmáticos de leptina, redução da expressão gênica de CD-36 e aumento da expressão dos genes acetil-CoA carboxilase-1 e faz estão associadas a menor deposição de gordura no fígado. Além disso, o exercício físico de baixa intensidade foi capaz de aumentar a atividade da catalase e reduzir a expressão da citocina pró-inflamatória interleucina-6, sugerindo um papel protetor contra a progressão da DHGNA. Dessa forma, conclui-se que o exercício físico de baixa intensidade se apresenta como uma ferramenta promissora para o manejo da DHGNA associada à SMet por sua capacidade de reduzir a esteatose hepática e modular parâmetros associados à inflamação e ao desequilíbrio redox, os quais contribuem para a progressão do comprometimento hepático.

**Palavras-chave:** doença hepática gordurosa não alcoólica; síndrome metabólica; camundongo; exercício, natação.

## ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) refers to a large spectrum of liver damage resulting from the accumulation of lipids in the liver. There is two types of NAFLD: (1) associated with metabolic syndrome (MetS) and (2) independent of MetS. Clinical guidelines recommend moderate or high intensity exercise as a strategy for the treatment of metabolic dysfunctions, among them the NAFLD. However, such exercise leads to high metabolic and cardiovascular stress. The aim of this thesis was to investigate the hepatic and systemic effects of a low-intensity exercise protocol in the swimming mode in a murine-dietary model of NAFLD associated with MetS. C57B1 / 6 mice consumed high fat diet (58.4% of kilocalories derived from lipids) or standard diet (14% of kilocalories from lipids). After seven weeks of dietary intervention, a low- intensity exercise protocol started for swimming groups. The swimming protocol consisted of 2 sessions of 90 minutes per day, 5 days per week, for 4 weeks. The results indicated that high fat diet established the NAFLD phenotype associated with the metabolic syndrome in C57B1/6 mice with increased white adipose tissue, glucose intolerance, reduced insulin sensitivity, dyslipidaemia and hepatic steatosis. Low intensity physical exercise reversed all metabolic dysfunctions. The experimental swimming model avoided hepatic steatosis by regulating plasma levels of leptin, reducing CD-36 gene expression and increasing expression of ACC-1 and FAS genes. In addition, low-intensity physical exercise was able to increase the antioxidant activity of catalase and reduce the expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6, suggesting a protective role against the progression of NAFLD. Thus, we concluded that low intensity physical exercise is a promising tool for the management of NAFLD associated with MetS because of its ability to reduce hepatic steatosis and to modulate parameters associated with inflammation and redox imbalance, which contribute to the progression of NAFLD.

**Key words:** non-alcoholic fatty liver disease; metabolic syndrome; mice; exercise; swimming.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Vias do metabolismo glicêmico moduladas por dietas hipercalóricas e pelo exercício físico no fígado.....	28
<b>Figura 2.</b>	Vias do metabolismo hepático moduladas por dietas hipercalóricas e pelo exercício físico.....	31
<b>Figura 3.</b>	Delineamento experimental.....	39
<b>Figura 4.</b>	Aparatos para execução do protocolo de natação.....	40
<b>Figura 5.</b>	Calendário do protocolo de natação.....	41
<b>Figura 6.</b>	Consumo de dieta e ingestão hídrica de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação...	51
<b>Figura 7.</b>	Tolerância à glicose de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	52
<b>Figura 8.</b>	Resistência à insulina de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	54
<b>Figura 9.</b>	Função das células $\beta$ -pacreáticas de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	55
<b>Figura 10.</b>	Massa corporal de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	57
<b>Figura 11.</b>	Índice de adiposidade branca e concentração plasmática de leptina de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	58
<b>Figura 12.</b>	Massa de tecidos adiposos de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	59
<b>Figura 13.</b>	Perfil lipídico plasmático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	61
<b>Figura 14.</b>	Cortes histológicos de fígado de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	62
<b>Figura 15.</b>	Perfil lipídico hepático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	63
<b>Figura 16.</b>	Perfil lipídico nas fezes de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	64
<b>Figura 17.</b>	Concentração plasmática de enzima marcadoras de dano hepático em camundongos submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	65
<b>Figura 18.</b>	Expressão gênica de proteínas transportadoras de produtos do metabolismo lipídico no tecido hepático de camundongos C57Bl/6	66

submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação...

<b>Figura 19.</b>	Expressão de genes lipogênicos no tecido hepático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	67
<b>Figura 20.</b>	Expressão gênica de fator de necrose tumoral- $\alpha$ e interleucina-6 no tecido hepático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	68
<b>Figura 21.</b>	Atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase no tecido hepático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.....	69
<b>Figura 22.</b>	Modificações metabólicas decorrentes do protocolo de exercício físico de baixa intensidade na modalidade natação em camundongos C57Bl/6 com DHGNA associada à SMet.....	79
<b>Quadro 1.</b>	Critérios para diagnóstico de síndrome metabólica em humanos.....	19
<b>Quadro 2.</b>	“Primers” utilizados para a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real em amostras de fígado.....	47
<b>Quadro 3.</b>	Interpretação do grau de correlação a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Perason ou Spearman.....	50

## **LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1. Perfil biométrico, bioquímico e tecidual de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação... 60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 11 $\beta$ HSD1: receptores de glucocorticóide e 11- $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1
- ACAT: ésteres de colesterol pela ação da acil-CoA:colesterol aciltransferase
- ACC: Acetil-co-enzima-A carboxilase
- Acetil-CoA: Acetil co-enzima-A
- ACLY: ATP citrato liase
- AGNE - ácidos graxos não-esterificados
- AGNE: ácidos graxos não-esterificados
- Akt: proteína quinase B
- ALT: alanina aminotransferase
- AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
- Ang: Angiotensina
- ANOVA: análise de variância
- APPL1: proteína adaptadora endosomal
- AST: aspartato aminotransferase
- ATGL: lipase de triacilglicerol do adipócito
- ATP: adenosina trifosfato
- ATP-III: National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
- TAM: tecido adiposo marrom
- CAT: Carnitina/acetil-CoA
- COX: citocromo c oxidase
- CPT1: carnitina/palmitoil-transferase-1
- CT/NAT: grupo controle sedentário + natação
- DCV: Doenças cardiovasculares
- CT/SED: grupo controle sedentário
- DGAT: diacilglicerol aciltransferase
- ECA: enzima conversora de angiotensina
- ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
- EPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase
- EROs: espécies reativas de oxigênio
- ETC: cadeia de transporte de elétrons
- FAS: ácido graxo sintase
- FoxO1: forehead box protein O1

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
G6Pase: glicose-6-fosfatase  
GSK3 $\beta$ : glicogênio sintase quinase 3 beta  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio  
HDL: lipoproteína de alta densidade  
HFD: dieta hiperlipídica  
HFrD: dieta com alto teor de frutose  
HIT: treinamento intervalado de alta intensidade  
HOMA- $\beta$ : índice do modelo de avaliação da homeostase de células  $\beta$ -pancreáticas  
HOMA-IR: índice do modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina  
HSL: lipase hormônio sensível  
HSL: lipase hormônio sensível  
ICBS – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
IDF: International Diabetes Federation  
IL: interleucina  
IRS: substrato do receptor de insulina  
LDL: lipoproteína de baixa densidade  
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos  
MDC: Max Delbrück Center for Molecular Medicine  
MCPs: proteínas quimioatraentes de monócitos  
MIPs: proteínas inflamatórias de macrófagos  
MIT: treino contínuo de intensidade moderada  
MPK-3: mitogen-activated protein phosphatase-3  
mTOR: proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos  
PANDER: fator derivado do pâncreas  
PBS: tampão fosfato-salino  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
PGC-1 $\alpha$ : co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma  
PI3K: inositol trifosfato 3-quinase  
PKA: proteína quinase A  
PPAR- $\alpha$ : receptores ativados por proliferadores de peroxisoma-alfa  
PWD: dieta ocidental palatável  
RI: receptor de insulina  
S6K1: S6 quinase1

SCD-1: esteroil-CoA dessaturase-1

SER: Elemento de regulação do esterol

SMet – Síndrome Metabólica

SMet/ NAT: Grupo Síndrome metabólica + natação

SMet/SED: Grupo Síndrome metabólica sedentário

SOD: Superóxido dismutase

SRA: Sistema renina-angiotensina

SREBP-1: Proteína de ligação do elemento de regulação do esterol-1

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: ciclo do ácido tricarbóxico

TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento  $\beta$

TIMP-1: inibidores teciduais de metaloproteinases-1

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TRB3: tribbles-related protein 3

Tyg: índice do produto de triglicerídeos e glicemia de jejum

UCP-1: proteína desacopladora 1

UFAL: Universidade Federal de Alagoas

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1	Síndrome metabólica induzida por dieta em camundongos.....	21
2.2	Protocolos de exercício aplicados para tratamento da síndrome metabólica em camundongos.....	23
2.3	Efeitos do exercício sobre a deposição de gordura induzida por dieta hipercalórica em camundongos.....	24
2.4	Perfil lipídico de camundongos alimentados com dieta hipercalórica e submetidos a protocolos de exercício físico.....	25
2.5	Modulação do metabolismo da glicose no músculo esquelético e fígado de camundongos alimentados com dietas hipercalóricas e submetidos a protocolos de exercício físico.....	26
2.6	Estrutura e função hepáticas em camundongos alimentados com dietas hipercalóricas e submetidos a protocolos de exercício físico.....	29
2.7	Efeitos do exercício físico sobre a massa e o funcionamento do tecido adiposo branco em camundongos.....	32
2.8	Capacidade oxidativa do músculo esquelético de camundongos alimentados com dietas hipercalóricas e submetidos a protocolos de exercício físico.....	34
2.9	Efeitos do exercício físico no estado pró-inflamatório induzido por dietas hipercalóricas em camundongos.....	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
<b>4</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	Animais.....	38
4.2	Delineamento experimental.....	39
4.3	Acompanhamento animal.....	39
4.4	Protocolo de natação.....	40
4.5	Testes metabólicos.....	41
4.5.1	Teste de tolerância a glicose.....	41
4.5.2	Teste de resistência à insulina.....	41
4.6	Cálculo dos índices HOMA-IR, HOMA- $\beta$ e Tyg.....	42

<b>4.7</b>	<b>Eutanásia dos animais.....</b>	<b>42</b>
<b>4.8</b>	<b>Cálculo da massa relativa dos tecidos e índice de adiposidade.....</b>	<b>43</b>
<b>4.9</b>	<b>Extração de lipídios totais.....</b>	<b>43</b>
<b>4.10</b>	<b>Obtenção de homogenato hepático.....</b>	<b>44</b>
<b>4.11</b>	<b>Dosagens bioquímicas em microplaca.....</b>	<b>44</b>
4.11.1	Colesterol e triglicerídeos.....	44
4.11.2	Cálculo da concentração de VLDL.....	45
4.11.3	Ácidos graxos não-esterificados.....	45
4.11.4	Marcadores de dano hepático.....	45
4.11.5	Mensuração da atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido hepático	46
4.11.6	Mensuração da atividade da catalase no tecido hepático.....	46
<b>4.12</b>	<b>Dosagens realizadas por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)</b>	<b>46</b>
<b>4.13</b>	<b>PCR real time.....</b>	<b>47</b>
<b>4.14</b>	<b>Processamento histológico.....</b>	<b>48</b>
<b>4.15</b>	<b>Equipamentos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.16</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Consumo de dieta e ingestão hídrica.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Metabolismo glicêmico.....</b>	<b>51</b>
<b>5.3</b>	<b>Composição corporal.....</b>	<b>55</b>
<b>5.4</b>	<b>Perfil lipídico.....</b>	<b>60</b>
<b>5.5</b>	<b>Marcadores de dano hepático.....</b>	<b>64</b>
<b>5.6</b>	<b>Expressão gênica de proteínas transportadoras de produtos do metabolismo lipídico no tecido hepático.....</b>	<b>65</b>
<b>5.7</b>	<b>Expressão de genes lipogênicos no tecido hepático.....</b>	<b>66</b>
<b>5.8</b>	<b>Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no tecido hepático.....</b>	<b>68</b>
<b>5.9</b>	<b>Enzimas antioxidantes no fígado.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>LIMITAÇÕES.....</b>	<b>80</b>

<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>92</b>
	APÊNDICE A – Descrição dos protocolos experimentais empregados em cada estudo analisado na revisão de literatura.....	92
	<b>ANEXO.....</b>	<b>104</b>
	ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	104

## 1. INTRODUÇÃO

O termo doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) refere-se a um amplo espectro de danos hepáticos decorrentes do acúmulo de lipídios no fígado que pode variar desde a esteatose à esteato-hepatite, podendo evoluir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular.<sup>1,2</sup> Segundo a Sociedade Brasileira de Hepatologia, estima-se que 20% a 30% da população mundial seja portadora da DHGNA.<sup>3</sup> Esta pandemia ocorre concomitante ao crescimento da prevalência mundial de outras disfunções metabólicas tais como a obesidade<sup>4</sup> e a síndrome metabólica (SMet).<sup>5</sup>

A esteatose hepática corresponde à primeira fase da DHGNA e caracteriza-se por acúmulo excessivo de triglicerídeos nos hepatócitos.<sup>6</sup> Classicamente foram propostos dois “hits” no desenvolvimento da doença<sup>7</sup>: o primeiro corresponde à esteatose associada à resistência à insulina, decorrente de aumento da lipogênese e redução da oxidação de lipídios; o segundo “hit” consiste na elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) capazes de mediar a inflamação e citotoxicidade, culminando em esteato-hepatite e fibrose<sup>8</sup>. Propôs-se, ainda, um terceiro “hit” baseado no fato de que o aumento de EROs no tecido hepático promove a morte gradual e menor replicação de hepatócitos maduros, além de expansão de células progenitoras, resultando em cirrose hepática e carcinoma hepatocelular.<sup>8,9</sup>

Apesar de a teoria dos “hits” ser aceita até os dias atuais, alguns autores questionam esta visão linear do mecanismo fisiopatológico da DHGNA, uma vez que o acometimento e progressão da doença é variável em diferentes fenótipos metabólicos.<sup>10, 11, 12</sup> Diante disso, propõe-se uma patogênese multifatorial envolvendo influências genéticas, metabólicas e nutricionais.<sup>12</sup> De acordo com Tilg e colaboradores<sup>11</sup>, a evolução de esteatose hepática para esteato-hepatite pode ocorrer devido à inflamação ou independente desta. Em ambas situações se sugere a participação de fatores inflamatórios produzidos no intestino e tecido adiposo branco, falha na proteção antilipolítica hepática, estresse do retículo endoplasmático e imunidade inata como fatores envolvidos no desenvolvimento da DHGNA.<sup>11</sup>

Do ponto de vista clínico, indivíduos com DHGNA frequentemente apresentam distúrbios metabólicos como obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e hipertensão.<sup>13, 14, 15</sup> Mediante tal observação, propôs-se que a DHGNA pode ser um dos componentes da SMet.<sup>13</sup> No entanto, em 2008 foi identificada uma variação no gene PNPLA3 que predispõe os indivíduos à esteatose, inflamação hepática e fibrose,

independente da obesidade ou outras disfunções metabólicas.<sup>16</sup> Diante disso, propõe-se a existência de dois tipos de DHGNA: (1) associada à SMet e (2) independente da SMet.<sup>17</sup>

Dentre os componentes da SMet estão a obesidade abdominal, hipertensão arterial, dislipidemia, resistência à insulina, estado pró-inflamatório e estado pró-trombótico.<sup>18, 19</sup> Uma vez que esta síndrome se caracteriza pela ocorrência de diversos distúrbios concomitantes em um organismo, tem-se uma fisiopatologia de grande complexidade, pois ocorre a interação das vias metabólicas tornando-se difícil a identificação de fatores causais bem como dos mecanismos que levaram à condição patológica.<sup>20</sup> Tem-se discutido que o acúmulo de gordura no fígado pode ser uma consequência da SMet, mas também um fator desencadeador da síndrome.<sup>21, 14</sup>

Nas últimas décadas, o aumento da prevalência de SMet e DHGNA foi determinado, principalmente, pela drástica mudança de hábitos da sociedade com consumo excessivo de calorias e diminuição da realização de atividade física.<sup>22, 23</sup> Sendo assim, a mudança do estilo de vida é um dos fatores que compõem a recomendação terapêutica para tais disfunções metabólicas.<sup>23, 24</sup> Vários estudos demonstraram que o exercício físico é uma ferramenta promissora tanto para a prevenção quanto para o tratamento e controle dos diversos distúrbios metabólicos.<sup>25, 26, 27</sup>

Entende-se por exercício físico um tipo de atividade física planejada, estruturada e repetitiva realizada com o intuito de melhorar ou manter um ou mais dos componentes do condicionamento físico.<sup>28</sup> A partir desse conceito, pode-se identificar diversos tipos de exercício de acordo com suas características: tipo de contração muscular (isotônicos ou isométricos)<sup>29</sup>, deslocamento do corpo (dinâmicos ou estáticos)<sup>29</sup>, continuidade do esforço (contínuos ou intervalados)<sup>29</sup>, fonte energética (aeróbios ou anaeróbios)<sup>29</sup>, ou ainda de acordo com a intensidade dos esforços.<sup>29</sup>

No que se refere à intensidade, os exercícios são classificados com base no percentual de consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2</sub>), percentual da frequência cardíaca máxima (FC<sub>máx.</sub>) ou pela percepção de esforço, tendo-se as seguintes categorias: (1) muito leve, (2) leve, (3) moderado, (4) intenso ou (5) muito intenso.<sup>30</sup> Recomenda-se para a obtenção de condicionamento cardiorrespiratório exercícios de moderada à alta intensidade,<sup>31</sup> os quais são também empregados para o tratamento ou prevenção da DHGNA.<sup>32, 33</sup> Para indivíduos com distúrbios metabólicos, recomenda-se a realização de exercício sob monitorização em programas de reabilitação devido ao risco de eventos cardiovasculares durante o estresse físico.<sup>34</sup> No entanto, observa-se grande dificuldade de adesão aos programas de reabilitação metabólica.<sup>35, 36</sup>

Neste contexto, o exercício de baixa intensidade pode ser uma alternativa para prescrição de programas de exercício não supervisionado ou para exercícios em grupo. Desta forma, propõe-se a investigação dos efeitos hepáticos e sistêmicos de um protocolo de exercício de baixa intensidade na modalidade natação em um modelo murino-dietético de DHGNA associada à SMet.

Com base nas premissas elencadas, hipotetiza-se que o protocolo de natação de baixa intensidade empregado reduz a deposição de lipídios no fígado por meio de aumento do gasto energético e da redução da expressão de genes lipogênicos. Tais efeitos hepáticos estão, provavelmente, associados à melhoria do metabolismo glicêmico e lipídico, determinada por regularização dos níveis plasmáticos de glicose e lipídios.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Em 1988, Reaven descreveu um conjunto de distúrbios do metabolismo - resistência à insulina, concentração plasmática elevada de triglicerídeos e níveis plasmáticos reduzidos de lipoproteínas de baixa densidade (HDL) - que atuam como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). A princípio, tal condição clínica foi denominada de *Síndrome X*.<sup>37</sup> Esta passou a ser objeto de estudo de diversos grupos no meio acadêmico mediante o crescimento na prevalência de doenças metabólicas em todo o mundo chamou a atenção da comunidade científica para o estudo das correlações entre distúrbios do metabolismo de nutrientes (especialmente lipídios e glicose) e o risco para DCV. Tais estudos resultaram no aprimoramento do conceito de Síndrome X, que atualmente é denominada Síndrome Metabólica (SMet).

Nos dias atuais, considera-se obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão arterial, resistência à insulina, intolerância à glicose, estado pró-inflamatório e estado pró-trombótico como os componentes centrais da SMet.<sup>18, 19</sup> Para o diagnóstico de SMet em humanos, algumas organizações propuseram parâmetros que pudessem ser utilizados na prática clínica. Os critérios diagnósticos mais utilizados na atualidade são aqueles propostos pela “National Cholesterol Education Program’s Adult Treatment Panel III report” (ATP III) and “International Diabetes Federation” (IDF). Ambos propõem a mensuração de cinco variáveis: circunferência de cintura, triglicerídeos plasmático, HDL colesterol plasmático, pressão arterial e glicemia de jejum. De acordo com o ATP III, o indivíduo é diagnosticado com SMet se apresentar alteração em três dos cinco parâmetros supracitados de acordo com os pontos de corte estabelecidos.<sup>19</sup> Por outro lado, em conformidade com o IDF, é necessária a presença de

obesidade abdominal, identificada por aumento da circunferência de cintura, mais outras duas variáveis alteradas para o diagnóstico da síndrome.<sup>18</sup> O **quadro 1** apresenta os pontos de corte considerados em cada um dos critérios.

**Quadro 1 - Critérios para diagnóstico de Síndrome Metabólica em humanos.**

Variável	ATP III, 2004	IDF, 2005
<b>Obesidade abdominal</b> (Circunferência de cintura)		Valores estabelecidos de acordo com a origem étnica do indivíduo (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2005).
Homens	>102 cm	
Mulheres	>88 cm	
Triglicérides	≥ 150 mg/dL*	> 150 mg/dL*
<b>HDL colesterol</b>		
Homens	< 40 mg/dL*	< 40 mg/dL*
Mulheres	< 50mg/dL*	< 50mg/dL*
<b>Pressão arterial</b>	≥ 130/ ≥ 85 mmHg*	≥ 130/ ≥ 85 mmHg*
<b>Glicemia de jejum</b>	≥ 110 mg/dL*	≥ 100 mg/dL*

HDL: Lipoproteína de alta densidade; ATPIII: National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III report; IDF: Federação Internacional de Diabetes. \*Quando o indivíduo apresenta valores dentro do padrão de normalidade, mas faz uso de medicamento para controle da variável, considera-se como positivo o distúrbio deste componente.

Embora a investigação de DHGNA não faça parte do critério para diagnóstico da SMet, diversos autores postulam a associação entre estas duas condições.<sup>13, 14, 21, 38</sup> Ademais, a progressão da DHGNA está fortemente relacionada à resistência à insulina<sup>1, 39</sup>, disfunção do metabolismo glicêmico de grande importância nos mecanismos fisiopatológicos da síndrome.<sup>40</sup>

Apesar das evidências acerca da associação entre DHGNA e SMet, a associação dos diversos distúrbios metabólicos implica em mecanismos fisiopatológicos complexos e interligados. Dito isto, percebe-se a necessidade do emprego de técnicas de análise morfológica, bioquímica e/ou expressão gênica para investigar vias metabólicas envolvidas na patogênese da DHGNA bem como para o desenvolvimento de novas terapias. Para tanto, faz-se necessário o emprego de modelos animais, uma vez que estes compreendem um sistema biológico complexo similar ao organismo humano. Ademais, possibilitam o controle genético e de influências ambientais, além do emprego de procedimentos invasivos que não são permitidos nas pesquisas com seres humanos.<sup>41</sup>

Diversos modelos animais têm sido empregados para estudos da SMet, dentre os quais muitos desenvolvem DHGNA.<sup>42</sup> Animais da ordem Rodentia são comumente utilizados pelo fato de serem de pequeno porte e apresentarem características fisiológicas e genéticas homologas a humanos.<sup>43</sup> A comparação do genoma de humanos e camundongos mostrou a homologia genética em mais de 90% das regiões.<sup>44</sup> Isso sugere que ambas as espécies possuem um ancestral comum e justifica, parcialmente, as similaridades na apresentação fenotípica dos mecanismos fisiológicos entre elas. Atualmente é possível induzir SMet em roedores por intervenções farmacológicas, genéticas ou dietéticas.<sup>43, 45, 46</sup>

Modelos genéticos são adequados para a investigação de mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da SMet. Os primeiros modelos genéticos de SMet estão relacionados a deficiências na via da leptina, um hormônio secretado por adipócitos maduros que atua no hipotálamo para regular o consumo alimentar e o balanço energético.<sup>47</sup> Camundongos *Leptin-deficient (ob/ob)* não são capazes de produzir leptina. Algumas outras linhagens apresentam receptores de leptina com mutação, não funcional ou resistentes a ação do hormônio: camundongos *leptina receptor deficient (db/db)*, Ratos *Zucker fatty (ZF)*, Ratos *Zucker diabetic fatty (ZDF)*, Ratos *Goto-Kakizaki (GK)* e camundongos POUND. Embora os modelos supracitados apresentem fenótipos de SMet, Wong et al.<sup>43</sup> questionam a aplicabilidade dos resultados obtidos em estudos com tais animais para humanos, pois foi identificada grande variedade de mutações nos genes que codificam a expressão de leptina em camundongos, o que raramente acontece em humanos. Dessa forma, modelos genéticos podem não reproduzir o estado patológico da SMet em humanos.

Outro importante mecanismo envolvido na homeostase metabólica é o sistema renina-angiotensina (SRA). Tal sistema consiste em uma cascata enzimática na qual o angiotensinogênio é convertido em angiotensina (Ang) I e subsequentemente em Ang II pelas ações da renina e da enzima conversora de angiotensina (ECA) tipo 1, respectivamente.<sup>48</sup> Ang II reconhecidamente promove inflamação, estado pró-trombótico, perfil pró-oxidante e hipertensão.<sup>48;49</sup> Por outro lado, Ang II pode ser convertida no heptapeptídeo Ang 1-7 pela ação da enzima ECA2, o qual ativa o receptor Mas e exerce efeitos vasodilatadores pelo aumento da síntese de óxido nítrico endotelial e diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio.<sup>50</sup> Dessa forma, o eixo ACE2/Ang(1-7)/Mas contrabalança o eixo clássico SRA exercendo efeitos metabólicos e cardiovasculares protetivos.<sup>51</sup> Com base nesses mecanismos, foi desenvolvido um modelo animal de SMet com camundongos com deficiência do receptor Mas (*Mas receptor deficiente FVB/N mice*). A inatividade de tal receptor resulta em prejuízos

no metabolismo da glicose, lipídios e disfunção endotelial,<sup>52</sup> condição compatível com o fenótipo de SMet.

De modo semelhante, drogas como glutamato monossódico,<sup>53</sup> glicocorticoides,<sup>54</sup> antipsicóticos<sup>55</sup> e tioglicose de ouro<sup>56</sup> podem promover os distúrbios da SMet, no entanto os mecanismos de indução não representam a etiologia da síndrome em humanos. De fato, o crescimento da prevalência de SMet em todo o mundo está relacionada ao consumo excessivo de calorias e à diminuição do gasto energético. Tais condições podem ser reproduzidas em modelos animais de SMet induzidos por dieta. O fenótipo sindrômico pode ser promovido pelo consumo de dietas com alto conteúdo de quilocalorias provenientes de nutrientes específicos: carboidratos (frutose ou sacarose) ou lipídios.<sup>43</sup>

A adequação de modelos animais dietéticos ao estudo da SMet está bem documentada. Eles são amplamente utilizados para entender os efeitos de diversos tipos de tratamentos para a síndrome. Nesse cenário, o exercício físico tem sido proposto como uma ferramenta para reverter e/ou controlar as disfunções associadas à SMet. No entanto, exercício físico é um termo genérico e seus efeitos podem variar de acordo com a intensidade, carga, frequência ou modalidade praticada. Para animais experimentais, os principais modelos utilizados são: (1) exercício aeróbico: corrida em esteira ergométrica<sup>57</sup> ou natação,<sup>58</sup> (2) exercício resistido: por estimulação elétrica diretamente ou exercício por indução comportamental,<sup>59</sup> e (3) exercício voluntário espontâneo.<sup>60</sup>

## 2.1 Disfunções metabólicas em camundongos induzidas por dieta

Do ponto de vista bioenergético, o metabolismo dos mamíferos é um conjunto de reações endergônicas e exergônicas que proveem energia para o funcionamento celular.<sup>61</sup> Quando o consumo calórico excede o gasto energético, o excesso de energia é acumulado no corpo, principalmente no tecido adiposo branco ou depósitos ectópicos de gordura.<sup>62</sup> Neste sentido, o sobrepeso relaciona-se à SMet, pois a hipertrofia do tecido adiposo está associada com à sua disfunção e um estado pró-inflamatório que afetam suas propriedades funcionais além do funcionamento do sistema endócrino.<sup>62</sup>

Pode-se induzir o fenótipo de SMet em camundongos por meio da manipulação dietética. Dentre as dietas mais utilizadas para essa finalidade estão: (1) dieta com alto teor de gordura (HFD), (2) dieta rica em gordura combinada com bebida com alto teor de frutose (HFrD) e (3) dieta ocidental palatável (PWD), uma dieta rica em gordura e sacarose. Conforme descrito no **Apêndice A**, a dieta rica em gordura tem sido amplamente empregada para produzir o fenótipo sindrômico nos camundongos. As gorduras são caloricamente o mais

denso dos macronutrientes.<sup>63</sup> Enquanto 1g de carboidratos ou proteínas gera aproximadamente 4 kcal, os lipídios fornecem 9 kcal/g. Dessa forma, a gordura consumida na dieta pode ser usada para fornecer energia ao metabolismo celular ou armazenada em tecidos adiposos e sítios ectópicos.<sup>64</sup> Além da obesidade, a hipertrofia do tecido adiposo acarreta dislipidemia, estado pró-inflamatório e estresse oxidativo.<sup>62</sup> Esses dois últimos são componentes da SMet amplamente relacionados com a hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão.<sup>65</sup>

Em um estudo da década de 40, descreveu-se que ratos que consumiram uma dieta com 70% de quilocalorias proveniente de lipídios desenvolveram obesidade e hiperglicemia.<sup>65</sup> Atualmente, há uma grande variedade de dietas usadas para induzir SMet em animais e não há consenso acerca do percentual necessário para se considerar uma dieta hiperlipídica. Identifica-se na literatura dietas com alto teor de gordura com composições que variam de 33,4% a 72% de quilocalorias advindas de lipídios.

No que se refere ao emprego de carboidratos para a indução de SMet, a frutose é amplamente utilizada. Este macronutriente é um dos monossacarídeos mais consumidos na dieta ocidental.<sup>66</sup> Pode ser consumida isolada ou combinada com glicose, formando um dissacarídeo - sacarose.<sup>66</sup> A posição anatômica do fígado faz dele um órgão estratégico na absorção de carboidratos e aminoácidos,<sup>66</sup> sendo este o principal local de extração e metabolização de frutose. Diferente da glicose, a fosforilação da frutose ocorre pela ação da frutoquinase e seu catabolismo continua independente da fosfofrutoquinase, uma enzima necessária à glicólise.<sup>67</sup> Essas duas condições tornam o metabolismo da frutose mais simples do que o da glicose hepática.<sup>66</sup> A oxidação da frutose resulta na lipogênese porque os carbonos são usados para produzir ácidos graxos. Isso leva à redução da oxidação e aumento da síntese de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), acumulação de triglicerídeos e colesterol no fígado.<sup>43</sup> De fato, os animais que consomem HFrDs desenvolvem doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), com esteatose hepática, fibrose e infiltração de macrófagos.<sup>68</sup> A condição inflamatória e a produção, bem como o acúmulo de lipídios, favorecem a redução da sensibilidade à insulina,<sup>69</sup> resistência à insulina,<sup>69</sup> intolerância à glicose<sup>69</sup> e estresse oxidativo.<sup>70</sup> O fenótipo de SMet pode ser induzido em camundongos por dieta contendo mais de 60% do total de calorias advindas da frutose ou mais de 10% de frutose diluída na água de beber dos animais.<sup>71, 72, 73</sup>

No que diz respeito ao desenvolvimento de SMet a partir do consumo de sacarose, parece que o componente ativo na promoção de distúrbios metabólicos é a frutose.<sup>43</sup> Considerando que a sacarose contém 50% de frutose, dietas com alto teor de sacarose são

menos efetivas na produção de SMet quando comparadas a modelos induzidos por frutose em roedores.<sup>43</sup>

Considerando os efeitos das dietas ricas em gorduras e/ou carboidratos no metabolismo, alguns estudos combinam essas duas dietas. Kawanishi e colaboradores.<sup>68</sup> ofereceram uma dieta rica em gordura (59% de kcal de gordura) associada à ingestão líquida adicionada com 21% de frutose. Esta combinação induziu a obesidade e dano hepático.

## **2.2 Protocolos de exercício aplicados para tratamento da Síndrome Metabólica em camundongos**

Identificou-se à aplicação de 4 modalidade de exercício físico para camundongos em consumo de dietas hipercalóricas: corrida em esteira motorizada, natação, exercício voluntário em rodas disponíveis nas gaiolas e vibração de corpo inteiro. Os protocolos de exercício dos estudos citados nesta tese estão descritos no **Apêndice A**.

Em esteira motorizada, a maioria dos protocolos foi realizada 5 dias por semana. Apenas no estudo de Borg,<sup>74</sup> os camundongos treinaram 6 vezes por semana. Os protocolos de exercício mais curtos duraram 4 semanas<sup>75, 76</sup> e o período mais longo teve duração de 16 semanas.<sup>68, 77, 79</sup> A duração da sessão de treinamento variou entre 40 minutos e 70 minutos. A velocidade de corrida estabelecida para o treinamento foi bastante divergente entre os trabalhos: desde 12 m/min até 20 m/min, mas a velocidade mais utilizada foi de 12 m/min (oito estudos). Onze autores não relataram inclinação da esteira durante o treino. Naqueles que trouxeram essa informação, os animais corriam com 0%<sup>80, 81</sup>, 5%<sup>74, 82</sup> ou 12%<sup>83, 84</sup> de inclinação. Não houve relação de proporcionalidade entre inclinação e velocidade. Um estudo usou um programa de treinamento específico chamado "treinamento intervalado de alta intensidade" – HIT.<sup>85</sup> Os animais realizaram 10 tiros de corrida de 4 minutos com 25% de inclinação à 23m/min intercalados com 2 minutos de repouso ativo. Este protocolo durou 10 semanas.<sup>85</sup>

Os protocolos de natação foram realizados por 60 minutos, 5 dias por semana em cinco estudos. Destes, dois usaram carga de 5% do peso corporal do animal presa à ponta da cauda dos camundongos. Suga et al.<sup>75</sup> usaram um protocolo de 90 minutos, 5 dias por semana e no estudo de Lee et al.<sup>86</sup> os animais nadaram 60 minutos, 7 dias por semana. Dois outros estudos de um mesmo grupo<sup>87, 88</sup> aplicaram um protocolo onde os camundongos nadaram duas sessões de 30 minutos separadas por 5 minutos de descanso, 5 dias por semana, mas um desses dois estudos relatou o uso de carga com 5% de peso corporal na cauda dos animais.<sup>87</sup>

A variável mais heterogênea refere-se à duração do tratamento com exercício. Isso variou de 4 semanas a 12 semanas.

Nos estudos em que os animais se exercitaram voluntariamente, estes tinham acesso 24 horas por dia a rodas de corrida individuais.<sup>89, 90</sup> Um protocolo durou 6 semanas enquanto o outro durou 10 ou 14 semanas. Não houve monitoração do volume de exercício realizado por cada animal ou o consumo de oxigênio durante períodos ativos. Assim, não é possível avaliar a intensidade do exercício nesses protocolos ou as implicações dessa variável nos efeitos metabólicos.

Hunag e colaboradores<sup>91</sup> empregaram a vibração do corpo inteiro como uma estratégia para tratar SMet em camundongos C57Bl/6. Os animais permaneceram 15 minutos por dia sobre uma plataforma vibratória com amplitude de vibração de 2mm por 6 semanas. Foram utilizados dois protocolos de treinamento: baixa intensidade (5,6 Hz, 0,13 g de aceleração) ou alta intensidade (13 Hz, 0,68 g de aceleração).

### **2.3 Efeitos do exercício sobre a deposição de gordura induzida por dieta hipercalórica em camundongos**

Estudos previamente publicados demonstram que a intervenção com dieta hipercalórica é efetiva no aumento da massa corporal de camundongos.<sup>68, 74, 103</sup> Tal incremento foi evitado pelos protocolos de exercício físico em 21 estudos, dentre os 31 avaliados. Em outros 10 estudos, o exercício não foi eficaz para reduzir a massa corporal quando os animais foram alimentados com dietas hipercalóricas.<sup>59, 68, 74, 77, 78, 79, 82, 79, 91, 92, 100,</sup><sup>101</sup> Dentre os métodos aplicados nos estudos, não se identificaram parâmetros do exercício relacionados com sua eficácia ou não em evitar o ganho de massa corporal. Por outro lado, protocolos de exercício similares aplicados à mesma linhagem de camundongos obtiveram resultados diferentes em relação à massa corporal. Kelly e colaboradores<sup>104</sup> sugerem a existência de um mecanismo complexo na regulação da composição corporal em resposta ao exercício determinado pelo polimorfismo genético. Os autores demonstraram que regiões genômicas distintas são responsáveis por mudanças no peso, adiposidade e massa magra em resposta ao exercício. Dessa forma, a regulação de cada uma dessas mudanças deve ser regulada por mecanismos genéticos distintos, embora tais vias ainda não tenham sido esclarecidas.<sup>104</sup>

Nos grupos em que o exercício não foi eficaz na redução da massa corporal, não houve efeito sobre a massa de gordura epididimal. Apenas Baynard e colaboradores<sup>92</sup> encontraram diminuição de tecido adiposo epididimal em animais treinados, apesar de nenhum efeito sobre

a massa corporal. Por outro lado, 11 estudos mostraram que a redução da massa corporal associada ao exercício é determinada por menor massa de gordura epididimal.<sup>75, 82, 84, 89, 90, 91, 94, 95, 102, 103, 105</sup> Em um estudo com camundongos C57Bl/6 induzidos à SMet por meio de dieta hiperlipídica verificou-se que um protocolo de exercício de plataforma vibratória de corpo inteiro é capaz de evitar a deposição de gordura também em outros sítios, como o tecido adiposo retroperitoneal e perirrenal.<sup>91</sup>

A redução da massa adiposa em modelo murino-dietético pode ser potencializada por uma intervenção combinada de exercício e ingestão de dieta com baixo teor de gordura (LFD), a qual continha 10% de quilocalorias provenientes de lipídios.<sup>83</sup> Os animais que foram alimentados com LFD e treinaram apresentaram massa de tecido adiposo epididimal significativamente menor em comparação com aqueles que treinaram e consumiram HFD ou que consumiram LFD e eram sedentários.<sup>83</sup> Tais resultados sugerem que a mudança de hábitos de vida composta pela associação de prática de exercício físico e consumo de dieta LFD pode ser mais eficaz para a redução de tecido adiposo branco. Inesperadamente, Kawanishi e colaboradores<sup>77</sup> observaram um aumento na massa de tecido adiposo em animais treinados quando comparados com os sedentários.

Em relação à estrutura muscular, a dieta rica em gordura induz o acúmulo de lipídios no músculo esquelético, efeito este revertido pelo exercício.<sup>97</sup> De acordo com a análise lipidômica de Jordy e colaboradores,<sup>76</sup> há um depósito de triacilglicerol, diacilglicerol e ceramida no músculo esquelético dos camundongos alimentados com HFD, condição atenuada nos camundongos que realizaram o protocolo de corrida.

#### **2.4 Perfil lipídico de camundongos alimentados com dieta hipercalórica e submetidos a protocolos de exercício físico**

Estudos desenvolvidos com camundongos demonstraram elevação do colesterol plasmático associada ao consumo de dieta hipercalórica.<sup>75, 81, 86, 91, 95, 96, 97, 98, 102, 103</sup> Tal distúrbio foi revertido pelo exercício em quatro protocolos de corrida em esteira motorizada<sup>81, 96, 97, 98, 102</sup>, três protocolos de natação<sup>86, 102, 103</sup> e um de vibração de corpo inteiro.<sup>91</sup> Sobre as frações de colesterol, apenas dois estudos avaliaram a lipoproteína de baixa densidade (LDL), as quais estavam elevadas em animais alimentados com HFD e foram reduzidas pelo exercício.<sup>86, 102</sup> Por outro lado, os resultados sobre HDL-C são contraditórios. De quatro estudos que analisaram o HDL-C no plasma,<sup>81, 86, 96, 102</sup> dois apresentaram efeito da HFD em aumentar<sup>86, 102</sup> e um em reduzir o HDL-C. Fu et al.<sup>96</sup> não encontraram efeito da HFD sobre a modulação dos níveis plasmáticos de HDL-C. Tal estudo não disponibilizou o conteúdo de

macronutrientes da HFD fornecida aos camundongos, portanto, não é possível estabelecer se a ausência de efeito está relacionada à composição da dieta. No que diz respeito ao efeito do exercício, em dois estudos que implementaram a corrida em esteira motorizada para camundongos, o HDL-C estava elevado nos animais que se exercitavam e consumiam a HFD em comparação com seus controles sedentários.<sup>81, 96</sup> Por outro lado, em dois estudos que empregaram protocolos de natação, o exercício físico não foi eficaz em modular essa lipoproteína.<sup>86, 102</sup>

HFD elevou os triglicerídeos plasmáticos em nove estudos.<sup>75, 81, 91, 95, 96, 97, 98, 102, 103</sup> Em apenas um desses estudos o exercício, que consistia em um protocolo de natação de 90 minutos por dia, 5 dias por semana durante 4 semanas, não foi eficaz em reduzir os níveis de triglicerídeos no plasma.<sup>75</sup> Três estudos mostraram que HFD elevou os níveis de ácidos graxos livres no plasma dos camundongos<sup>75, 81, 96</sup>. Os dois protocolos de corrida evitaram tal distúrbio dislipidêmico, enquanto o protocolo de natação não teve efeito. Em resumo, HFD é eficaz para promover dislipidemias em camundongos: aumento do colesterol total, colesterol LDL, triglicerídeos, ácidos graxos livres e redução do colesterol HDL. Protocolos de natação, corrida em esteira motorizada e vibração do corpo inteiro foram capazes de reverter o perfil dislipidêmico no que se refere ao colesterol total, LDL e triglicerídeos. No entanto, a melhoria nos níveis de HDL e ácidos graxos livres esteve presente apenas nos estudos que empregaram protocolos de corrida em esteira motorizada.

## **2.5 Modulação do metabolismo da glicose no fígado de camundongos alimentados com dietas hipercalóricas e submetidos a protocolos de exercício físico**

Dentre os estudos analisados, 20 avaliaram marcadores do estado glicêmico. Os resultados endossam o efeito do consumo de dietas hipercalóricas como causador de resistência à insulina<sup>75, 77, 79, 81, 82, 87, 89, 90, 91, 92, 97</sup> e intolerância à glicose<sup>75, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 93, 96, 97, 98, 102, 103</sup>. Enquanto sete estudos mostraram efeito da HFD em elevar a glicemia<sup>75, 82, 91, 94, 100, 101, 103</sup>, no trabalho de Vieira et al.<sup>82</sup> o consumo de HFD não alterou a glicemia de jejum, mesmo em animais com intolerância à glicose e resistência à insulina. Isso sugere que os camundongos podem ter um distúrbio no metabolismo da glicose, mesmo mantendo a glicemia de jejum em níveis regulares.

Comparando-se os efeitos de protocolos de treino contínuo de intensidade moderada (MIT) com HIT, sugere-se que o ECMI tem maior efetividade na regulação do perfil glicêmico de camundongos alimentados com dieta HFD.<sup>106, 107</sup>

Conforme relatado acima, a resistência à insulina é um distúrbio muito comum em modelos animais alimentados com dieta hipercalórica caracterizada por incapacidade ou redução da ativação do receptor de insulina (RI) ou sua sinalização. A ação do RI foi classicamente estabelecida no metabolismo da glicose de tecidos como fígado, tecido adiposo branco e músculo, mas atualmente reconhece-se sua atuação em outros tecidos como placenta e cérebro.<sup>108</sup>

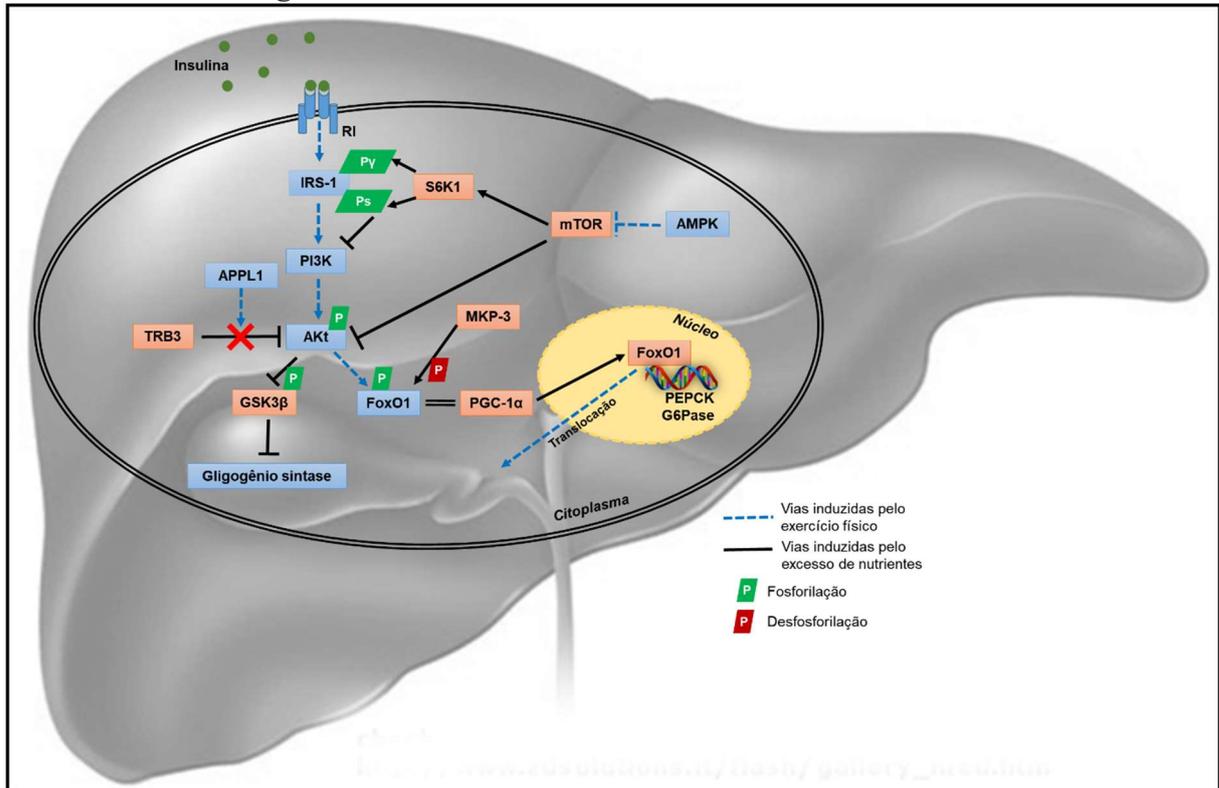
Nos hepatócitos (**Figura 1**), o excesso de nutrientes promove a fosforilação ou desacoplamento da serina do substrato do receptor de insulina tipo 1 (IRS-1) pela ativação da proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), a qual ativa S6 quinase 1 (S6K1) e desativa a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK).<sup>109</sup> Além disso, a ativação do mTOR ou associação com a proteína TRB3 bloqueia a atividade das proteínas quinase B (Akt). Com redução da atividade desta quinase, esta não fosforila a glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) que, por sua vez, é ativada, fosforila a enzima glicogênio sintase, inativa-a.<sup>100</sup> Desta forma, a redução da sinalização da insulina no fígado resulta em redução da produção de glicogênio e consequente aumento da concentração de glicose no citoplasma do hepatócito. Esta é oxidada por glicólise e fornece substrato para a síntese de triglicerídeos, o que contribui para a deposição de lipídios no fígado.<sup>110</sup>

Outro mecanismo que pode aumentar a glicemia é a produção de glicose a partir de precursores não glicídicos (lactato, piruvato, aminoácidos e glicerol) pelo processo de gliconeogênese. Pauli et al.<sup>101</sup> demonstraram que em animais alimentados com dieta rica em gordura, há maior expressão de proteína fosfatase-3 (MKP-3) e sua associação com a proteína FoxO1 (MKP-3/FoxO1). MKP-3 desfosforila FoxO1, o que aumenta a associação entre FoxO1 e o co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ). Este mecanismo está relacionado ao aumento da expressão de genes gliconeogênicos: fosfoenolpiruvato carboxiquase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase).<sup>100, 101</sup>

Neste contexto, o exercício físico evitou os distúrbios descritos anteriormente sobre o metabolismo da glicose causado pelo consumo de HFD no tecido hepático. Em 3 estudos os protocolos de natação foram capazes de ativar a AMPK que, por sua vez, inibe a via mTOR / S6K1, o que resulta na sinalização dos receptores de insulina e diminui a gliconeogênese.<sup>88, 101, 100</sup> Além disso, nos animais submetidos cronicamente ao treinamento físico, observou-se um aumento na expressão da proteína adaptadora endosomal (APPL1) e sua interação com Akt, o que reduz a associação TRB3/Akt. Desta forma, Akt é fosforilada pelo inositol trifosfato 3-quinase (PI3K) e torna-se uma enzima ativa. A Akt fosforila dois substratos: FoxO1 e glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ). A fosforilação de Foxo1 e a diminuição

nos níveis de PGC-1 $\alpha$  dificultam a associação FoxO1/PGC-1 $\alpha$  e, conseqüentemente, reduzem a expressão do gene PEPCK e G6Pase.<sup>100, 101</sup> A fosforilação de GSK3 $\beta$  inativa esta enzima levando a uma menor fosforilação da enzima glicogênio sintase, o que aumenta a atividade enzimática. Isso aumenta a produção e o armazenamento de glicogênio<sup>100</sup> (Figura 1).

**Figura 1 - Vias do metabolismo glicêmico moduladas por dietas hipercalóricas e pelo exercício físico no fígado**



O **excesso de nutrientes** promove a fosforilação ou desacoplamento da serina do substrato do receptor de insulina tipo 1 (IRS-1) pela ativação da proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), a qual ativa S6 quinase 1 (S6K1) e desativa a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). A ativação do mTOR ou associação com a proteína TRB3 bloqueia a atividade das proteínas quinase B (Akt). Com redução da atividade da Akt, esta não fosforila a glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) que torna-se ativa, fosforila a enzima glicogênio sintase tornando-a inativa. Há maior expressão de proteína fosfatase-3 (MKP-3) e sua associação com a proteína FoxO1 (MKP-3/FoxO1). MKP-3 desfosforila FoxO1, o que aumenta a associação entre FoxO1 e o coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ). Este mecanismo está relacionado ao aumento da expressão de genes gliconeogênicos: fosfoenolpiruvato carboxiquase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase). O **exercício físico** ativa a AMPK que, por sua vez, inibe a via mTOR / S6K1. Há aumento na expressão da proteína adaptadora endossomal (APPL1) e sua interação com Akt, o que reduz a associação TRB3/Akt. Desta forma, Akt é fosforilada pelo inositol trifosfato 3-quinase (PI3K) e torna-se uma enzima ativa que fosforila dois substratos: FoxO1 e glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ). A fosforilação de Foxo1 e a diminuição nos níveis de PGC-1 $\alpha$  dificultam a associação FoxO1/PGC-1 $\alpha$  e, conseqüentemente, reduzem a expressão do gene PEPCK e G6Pase. A fosforilação de GSK3 $\beta$  inativa esta enzima levando a uma menor fosforilação da enzima glicogênio sintase.

Fonte: elaborada pela doutoranda

## 2.6 Estrutura e função hepáticas em camundongos alimentados com dietas hipercalóricas e submetidos a protocolos de exercício físico

Nesta revisão, 14 estudos avaliaram os efeitos de dietas hipercalóricas e do exercício físico na estrutura e/ou função do fígado em camundongos. A massa hepática foi estatisticamente maior nos animais que consumiram dietas ricas em frutose<sup>68</sup> ou lipídios<sup>86, 103</sup> quando comparados a animais alimentados com dieta padrão ou que realizaram protocolos de exercício físico. Por outro lado, outros dois estudos não mostraram diferenças entre os grupos avaliados no que se refere à massa hepática.<sup>90, 92</sup>

Apesar da inconsistência de dados sobre a massa total do fígado, o excesso de consumo de nutrientes afetou marcadamente a estrutura do tecido. Os animais em intervenção dietética apresentaram esteatose hepática, caracterizada por deposição de gordura no fígado, fibrose e infiltração de macrófagos.<sup>68, 91, 95, 102, 103</sup> A análise dos lipídios acumulados no fígado mostrou que as dietas hipercalóricas promovem um aumento na concentração de triglicerídeos<sup>76, 83, 92, 103</sup>, diacilglicerol<sup>76</sup> e colesterol total.<sup>103</sup> O aumento de marcadores de dano tecidual como alanina aminotransferase (ALT),<sup>68, 91, 95, 102</sup> aspartato aminotransferase (AST);<sup>91, 95, 102</sup> e fosfatase alcalina<sup>102</sup> confirmam a lesão hepática em camundongos alimentados com dietas hipercalóricas. O exercício físico reduziu todas as alterações na estrutura do fígado e marcadores de lesões hepáticas, mesmo na manutenção da intervenção dietética.<sup>68, 76, 82, 91, 92, 95, 102, 103</sup>

A esteatose hepática pode ocorrer devido ao consumo excessivo de nutrientes, aumento da síntese de gordura (lipogênese), redução da oxidação da gordura ou redução da exportação de gordura sob a forma de LDL.<sup>111</sup> No fígado o metabolismo de glicose, aminoácidos ou ácidos graxos resulta na produção de acetil-CoA, uma molécula que entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para liberar energia química como trifosfato de adenosina (ATP).<sup>112</sup> O piruvato proveniente da oxidação da glicose e os aminoácidos podem transpor a membrana mitocondrial. Por outro lado, os ácidos graxos são degradados para formar acil-CoA, o qual precisa da enzima carnitina/palmitoil-transferase-1 (CPT1) para entrar na matriz mitocondrial e ser oxidada na  $\beta$ -oxidação gerando acetil-CoA<sup>109, 113</sup> (**Figura 2**).

O acetil-CoA derivado de ácidos graxos, glicose ou aminoácidos pode retornar ao citosol pela ação da proteína carnitina/acetil-CoA (CAT) ou na forma de citrato proveniente do TCA. No citosol, o citrato gera acetil-CoA através da ATP-citrato liase (ACLY). No cytosol, a acetil-CoA é carboxilada para malonil-CoA pela acetil-coenzima A carboxilase-1

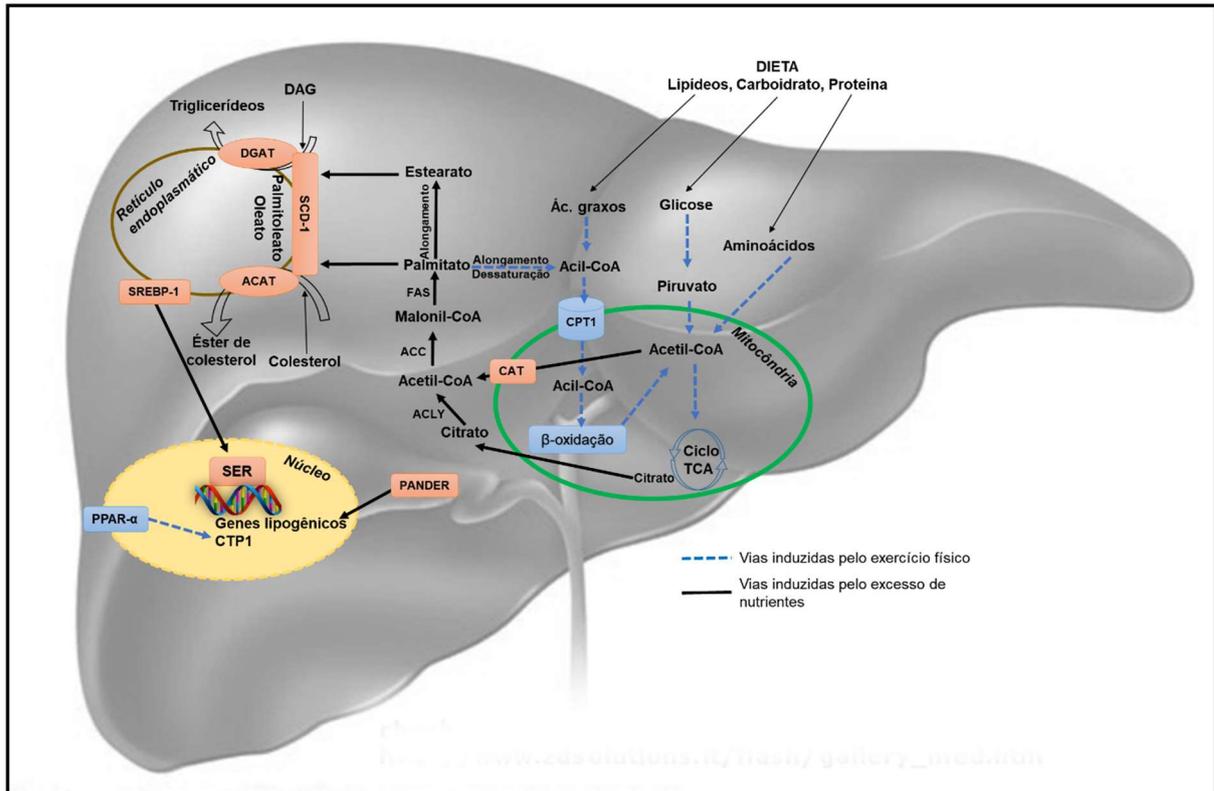
(ACC1). As reações da enzima ácido graxo sintase(FAS) geram palmitato que pode ser usado para produzir triglicerídeos e ésteres de colesterol ou voltar às mitocôndrias.<sup>113</sup>

Uma vez que permaneça no citosol (**Figura 2**), o alongamento de palmitato (16:0) forma estearato (18:0), ambos os ácidos graxos saturados são convertidos em ácidos graxos monoinsaturados (palmitoleato e oleato, respectivamente) pela ação de uma enzima do retículo endoplasmático: esteroil-CoA dessaturase-1 (SCD- 1). O palmitoleato (16:1) ou o oleato (18:1) participam da síntese de triglicerídeos pela ação da diacilglicerol aciltransferase (DGAT) e de ésteres de colesterol pela ação da acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT).<sup>114</sup>

O metabolismo de lipídios no fígado é controlado por fatores que regulam a transcrição de genes envolvidos na síntese ou oxidação de gordura. Proteínas de ligação do elemento de regulação do esterol (SREBPs) são fatores de transcrição inseridos no retículo endoplasmático. Na ausência de esterol nas células, o SREBP é ativado e entra no núcleo onde se liga ao elemento de regulação do esterol (SER) e ativa os genes lipogênicos (FAS, ACC, SCD-1).<sup>113</sup> De modo semelhante, o fator derivado do pâncreas (PANDER) é expresso em hepatócitos e aumenta a expressão de genes lipogênicos que contribuem para a esteatose hepática.<sup>115</sup> Os receptores ativados por proliferadores de peroxisoma (PPARs) atuam na patogênese da DHGNA por modulação da  $\beta$ -oxidação hepática e lipogênese. Na ausência de expressão de PPAR- $\alpha$  no fígado, a transcrição do seu gene alvo CPT-1 é prejudicada (**Figura 2**). Nesta condição, o acil-CoA não pode entrar na matriz mitocondrial para a oxidação e há uma produção aumentada de triglicerídeos e ésteres de colesterol nas vias citoplasmáticas.

Nesta revisão, verificou-se que as dietas hipercalóricas aumentaram os níveis de SRBP-1c<sup>107</sup> e das proteínas lipogênicas FAS,<sup>96</sup> SCD-1<sup>94; 103</sup> e DGAT<sup>76; 103</sup>, e diminuíram a fosforilação da enzima ACC, a qual demonstrou menor atividade.<sup>94</sup> Isto revela que o consumo excessivo de nutrientes aumenta a deposição de gordura hepática por ativação da via ACC/FAS/SCD-1. Além disso, as dietas com alto teor de gordura são capazes de modular a expressão gênica do fígado para aumentar a lipogênese por meio da ativação de SRBP-1 e PANDER e aumento da expressão de FAS e SCD-1. A redução dos níveis das proteínas PPAR- $\alpha$ <sup>102</sup> e CPT-1<sup>94</sup> sugerem uma possível diminuição na oxidação de gorduras. Dois outros estudos<sup>86, 103</sup> encontraram expressão gênica aumentada de PPAR- $\alpha$  e CPT-1 em animais alimentados com HFD quando comparados com aqueles alimentados com dieta padrão, no entanto esse aumento foi ainda mais pronunciado nos camundongos que realizaram exercício físico.

**Figura 2 - Vias do metabolismo hepático moduladas por dietas hipercalóricas e pelo exercício físico**



O consumo crônico de **excesso de nutrientes** estimula vias lipogênicas e reduz a oxidação de gordura. Há maior transporte de acetil-CoA através da carnitina/acetil-CoA (CAT) e de citrato para o citoplasma. O citrato é convertido em acetil-coA que por ação da acetil-co-enzima-A carboxilase (ACC) transforma-se em Malonil-CoA. A enzima ácidograzo sintase (FAS) catalisa a reação para produção de palmitato que pode ser usado para produzir triglicerídeos e ésteres de colesterol ou voltar às mitocôndrias. Uma vez que permaneça no citosol, o alongamento de palmitato (16:0) forma estearato (18:0), ambos os ácidos graxos saturados são convertidos em ácidos graxos monoinsaturados (palmitoleato e oleato) pela ação de uma enzima do retículo endoplasmático: estearoil-CoA dessaturase-1 (SCD- 1). O palmitoleato (16:1) ou o oleato (18:1) participam da síntese de triglicerídeos pela ação da diacilglicerol aciltransferase (DGAT) e de ésteres de colesterol pela ação da acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT). Há aumento da expressão de proteínas de ligação do elemento de regulação do estero (SREBPs) que, quando ativadas, entram no núcleo onde se ligam ao elemento de regulação do estero (SER) e ativam os genes lipogênicos (FAS, ACC, SCD-1). O fator derivado do pâncreas (PANDER) também aumenta a expressão de genes lipogênicos que contribuem para a esteatose hepática. O **exercício físico** promove aumento da oxidação de lipídios nas mitocôndrias, o que resulta na redução da deposição de gordura no fígado. Há aumento de transporte de acil-CoA para o interior da mitocôndria através da proteína transportadora carnitina/palmitoil transferase-1 (CPT1) que é convertida em acetil-CoA no processo de β-oxidação. O acetil-CoA é oxidado no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA). Há aumento da expressão de receptores ativados por proliferadores de peroxisoma-alfa (PPAR- α) que estimulam a transcrição gênica de CPT-1.  
 Fonte: elaborada pela doutoranda.

Os dados disponíveis na literatura sugerem fortemente que HFD aumenta a lipogênese. Por outro lado, todos os estudos analisados mostraram a eficácia do exercício físico na redução da lipogênese e aumento da oxidação de gordura nas mitocôndrias, o que resulta na redução da deposição de gordura no fígado.<sup>80, 86, 94, 102, 103</sup> Os camundongos nos grupos de

treinamento apresentaram diminuição na expressão gênica e proteica de proteínas lipogênicas, além de menor atividade dos fatores de transcrição SRBP-1, PANDER e aumento da expressão de PPAR- $\alpha$ . A análise de “microarrays” de cDNA mostrou que dos 62 transcritos de genes alterados nos camundongos alimentados com HFD, 38 foram completamente normalizados pelo exercício.<sup>86</sup> Mais do que aumentar o gasto de energia, o exercício físico atua em vias moleculares e expressão gênica, o que é uma promissora evidência de que o exercício desempenha papel fundamental no tratamento e / ou prevenção da DHGNA.

## **2.7 Efeitos do exercício físico sobre a massa e o funcionamento do tecido adiposo branco em camundongos**

As dietas hipercalóricas e a prática de exercícios podem alterar a estrutura do tecido adiposo e seu metabolismo.<sup>79, 95, 102</sup> Em relação ao tamanho dos adipócitos, os resultados são divergentes. Enquanto Kawanishi et al.<sup>77</sup> encontraram adipócitos menores em camundongos alimentados com HFD em comparação com seus controles exercitados e animais alimentados com dieta padrão, Marques et al.<sup>95</sup> e Schultz et al.<sup>102</sup> encontraram adipócitos hipertrofiados induzidos por HFD. Neste caso, o protocolo de natação reduziu o tamanho dos adipócitos,<sup>102</sup> mas não o protocolo de esteira.<sup>95</sup> Os camundongos alimentados com 60% de quilocalorias advindas de lipídios desenvolveram fibrose no tecido adiposo marcada pelo aumento da deposição de colágeno (1 $\alpha$  e 3 $\alpha$ ) em torno de adipócitos e ativação de fibroblastos.<sup>78</sup> Tais alterações morfológicas não foram encontradas nos animais que realizaram corrida em esteira motorizada.<sup>78</sup>

Os fatores fibrogênicos, como fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e inibidores teciduais de metaloproteinases-1 (TIMP-1), foram mais expressos no tecido adiposo de camundongos sedentários alimentados com HFD do que no grupo que realizou exercício físico ou consumiu dieta padrão.<sup>78</sup>

A alteração mais marcante encontrada no tecido adiposo branco de camundongos alimentados com dietas hipercalóricas foi a inflamação. Tal achado foi identificado em fotomicrografias que evidenciaram vários infiltrados inflamatórios no referido tecido.<sup>102</sup> A análise das células da fração vascular estromal demonstrou alto número de macrófagos e linfócitos.<sup>77</sup> Por outro lado, o recrutamento dessas células imunes para o tecido adiposo branco foi marcado por níveis<sup>78, 83, 93</sup> e expressão gênica<sup>89, 90, 92</sup> aumentados da proteína quimiotratante monocitária (MCP-1) e F4/80. Protocolos de exercício de modalidades variadas podem inibir ou reduzir o perfil inflamatório descrito anteriormente.<sup>77, 78, 83, 89, 90, 92, 93, 102</sup>

As dietas hipercalóricas também promovem um estado inflamatório no tecido adiposo pela modulação da produção de citocinas. HFDs aumentaram a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, tais como: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>77, 79, 83, 89, 92, 102</sup> interleucina (IL) -6<sup>79</sup> e IL-1<sup>83</sup>. HFD parece promover dano oxidativo, marcado pelo aumento da peroxidação lipídica (TBARS e Carbonyl) no tecido adiposo epididimal.<sup>87</sup> Tal estresse inflamatório e oxidativo induzido pelo consumo excessivo de nutrientes não ocorreu nos animais que participavam dos protocolos de exercício físico.

Além das características previamente descritas, a função endócrina do tecido adiposo é determinante para a homeostase energética. O hormônio leptina derivado do tecido adiposo branco atua sobre o hipotálamo e outros tecidos periféricos para regular o equilíbrio energético e a massa corporal. No estado pós-prandial a leptina é liberada na corrente sanguínea para promover a sensação de saciedade, o metabolismo de glicose e lipídios, a digestão intestinal e a absorção de nutrientes.<sup>47</sup> Por outro lado, a grelina, um hormônio intestinal, ativa neurônios orexigênicos no hipotálamo e estimula a expressão de proteínas associadas ao armazenamento de gordura como ACC, FAS, lipoproteína lipase e perilipina em adipócitos, estimulando o armazenamento de lipídios no citoplasma.<sup>116</sup> Apesar dos conhecimentos sobre o papel da via disfuncional da leptina em causar obesidade em camundongos,<sup>46</sup> há resultados divergentes quanto aos efeitos do consumo de dietas hipercalóricas sobre as vias da leptina e/ou de grelina. No estudo de Baynard<sup>92</sup> e colaboradores nenhuma diferença na expressão do gene da leptina no tecido adiposo foi encontrada em camundongos alimentados com HFD ou exercitados, no entanto em outro grupo de camundongos C57Bl/6 alimentados com o mesmo conteúdo de lipídios, a expressão gênica de leptina foi maior no grupo obeso.<sup>83</sup> Apenas um estudo avaliou a expressão da grelina em macrófagos peritoneais, o qual demonstrou uma redução nos animais que consumiram HFD e eram sedentários.<sup>89</sup>

A capacidade do exercício em promover lipólise no tecido adiposo foi descrita em dois estudos. A prática de exercício físico aumentou a concentração de lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL), lipase hormônio sensível (HSL), perilipina e citocromo c oxidase (COX) no tecido adiposo de camundongos alimentados com HFD,<sup>105</sup> ATGL e HSL atuam no citoplasma clivando triglicerídeos para libertar ácidos graxos e uma molécula de glicerol.<sup>117</sup> A perilipina é uma proteína do adipócito fosforilada por ação da proteína quinase A (PKA), necessária para a ativação da HSL. Estes processos lipolíticos fornecem ácidos graxos a serem metabolizados através da  $\beta$ -oxidação e da cadeia de transporte de elétrons (ETC) para produzir energia.<sup>117</sup> COX é uma enzima fundamental necessária para remover elétrons no

último passo da ETC.<sup>105</sup> Em um estudo com hamsters, Campbell et al. propuseram que a lipólise induzida pelo exercício é devida à ação dos glicocorticóides, através do aumento na quantidade de receptores e 11- $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11 $\beta$ HSD1).<sup>118</sup>

Os dados disponíveis reforçam que as dietas hipercalóricas promovem efeitos deletérios na estrutura e função do tecido adiposo. HFDs induzem fibrose, inflamação e estresse oxidativo. Protocolos de corrida, natação e exercício voluntário evitaram esta disfunção de tecido adiposo induzida por HFD e atuam em vias moleculares para aumentar a lipólise. Isso significa que o exercício reduz a massa de tecido adiposo branco e melhora a sua função.

## **2.8 Efeitos do exercício físico sobre o músculo esquelético de camundongos alimentados com dietas hipercalóricas**

O consumo de dieta hipercalórica por oito semanas prejudicou a capacidade de exercício, avaliada por um teste funcional em que os camundongos correm em velocidade progressiva até a fadiga (definida como permanência maior que 10 segundos na base da esteira, apesar do encorajamento manual).<sup>75</sup> Por outro lado, em protocolo mais curto de intervenção dietética, no qual os animais foram alimentados com HFD por apenas quatro semanas, não houve diferença significativa entre os grupos que consumiram dieta hiperlipídica ou padrão.<sup>76</sup> Esses resultados sugerem que o efeito da dieta hipercalórica na capacidade de exercício depende do tempo. A capacidade de exercício está relacionada à atividade oxidativa muscular. Nesse contexto, exercícios de diferentes modalidades, como corrida em esteira motorizada<sup>76, 80, 85</sup> e natação<sup>75</sup> aumentaram o consumo de oxigênio no músculo esquelético. Há, claramente, um aumento na atividade das enzimas oxidativas ( $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase,<sup>76</sup> citrato sintase,<sup>75, 76, 85</sup> malato desidrogenase<sup>75</sup>) e expressão gênica (succinato desidrogenase<sup>80</sup>) em animais treinados, mostrando que mesmo sob consumo de HFD o treinamento melhora o metabolismo aeróbio no músculo esquelético para produzir energia.

Suga et al.<sup>75</sup> estudaram a estrutura morfológica das mitocôndrias no músculo esquelético e mostraram que o consumo de HFD reduz o tamanho mitocondrial, a densidade e a expressão gênica relacionada à biogênese mitocondrial (PGC-1 $\alpha$ , PPAR- $\alpha$  e MFN1). O protocolo de natação empregado não conseguiu reverter esses distúrbios morfológicos. Entretanto, a associação de natação com dieta com restrição calórica melhorou a estrutura e função mitocondrial. Também neste estudo, os camundongos em dieta restritiva tiveram

melhora na capacidade de exercício comparados com aqueles que cumpriram o protocolo de natação e foram alimentados com HFD.

O acúmulo de lipídios intramiocelular, descrito anteriormente no item 2.3, parece estar relacionado à diminuição da utilização de ácidos graxos para produção de energia e ao aumento da lipogênese. Os camundongos alimentados com dietas com alto teor de gordura apresentaram comprometimento na atividade da via de sinalização AMPK/ACC/CPT-1<sup>98</sup> e aumento da clivagem de SREBP-1,<sup>97</sup> o que levou à redução da oxidação de lipídios e ao aumento da lipogênese, respectivamente. O exercício aumentou a expressão de AMPK e CPT-1 e inibiu a expressão de ACC, tanto nos animais que consumiram dieta padrão quanto HFD<sup>98</sup>. Além disso, o exercício inibiu a clivagem de SREBP-1c, fator de transcrição que ativa genes lipogênicos, por meio da via AMPK/mTOR/S6K1.<sup>97</sup>

No músculo esquelético, o estresse oxidativo induzido por HFD foi marcado pelo aumento da peroxidação lipídica, avaliada por meio de ensaio bioquímico para identificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); maior produção de superóxido ( $O_2^-$ ) e aumento na atividade de NADPH oxidase. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) também estava aumentado no plasma. O exercício foi eficaz para reduzir esses marcadores de estresse oxidativo quando associado a dieta restritiva, mas não sozinho.<sup>75</sup> Não houve efeito da dieta ou do exercício sobre a concentração de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) no músculo esquelético.<sup>75</sup>

Com base nesses resultados, conclui-se que o consumo de HFDs prejudica a capacidade oxidativa do músculo esquelético, principalmente, por redução da oxidação mitocondrial. À medida que a sinalização AMPK/ACC/CPT1 é prejudicada, o acil-CoA não pode ser transportado para a matriz mitocondrial e se acumula no citoplasma de miócitos. A redução na capacidade de exercício induzida por HFD atua como um fator de risco para o SMet, criando um ciclo vicioso: obesidade - diminuição da tolerância ao exercício - estilo de vida sedentário - obesidade. Os protocolos de natação<sup>75</sup> ou de corrida em esteira motorizada<sup>76, 80, 85, 96, 97, 98</sup> podem quebrar esse ciclo ao reverter distúrbios funcionais no músculo esquelético e melhorar a capacidade de exercício.

## **2.9 Efeitos do exercício físico no estado pró-inflamatório induzido por dietas hipercalóricas em camundongos**

A inflamação é um distúrbio central na fisiopatologia da obesidade e da SMet. Neste sentido, o tecido adiposo disfuncional é um sítio endócrino que contribui para promover a inflamação por infiltração e ativação macrofágica<sup>62</sup> Os macrófagos M1, presentes no tecido

adiposo branco, ativam o perfil pró-inflamatório aumentando a produção de CD11c, uma glicoproteína integrina expressa por monócitos, macrófagos e citocinas inflamatórias<sup>119</sup>. A imunidade adaptativa participa desse processo modulando a inflamação. As células T CD8<sup>+</sup> produzem proteínas quimioatraentes de monócitos (MCPs) e proteínas inflamatórias de macrófagos (MIPs) que modulam a infiltração de macrófagos no tecido adiposo.<sup>119</sup> Por outro lado, as células T CD4<sup>+</sup> podem exibir um duplo papel estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.<sup>120</sup>

Em camundongos alimentados com HFD, a infiltração de macrófagos é marcada pelo aumento da expressão de células F4/80<sup>83, 84, 89, 93</sup> no tecido adiposo branco. Somando-se, os produtos de macrófagos CD11c<sup>77</sup> e citocinas inflamatórias estão aumentados em animais que consomem dietas hipercalóricas. Ademais, o consumo de HFD foi relacionado ao aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ ; <sup>77, 83, 89, 102</sup> e níveis e expressão gênica IL-6 <sup>77, 83</sup> no tecido adiposo branco. Interessantemente, o exercício foi eficaz na redução da infiltração de macrófagos, níveis e expressão gênica tanto do TNF- $\alpha$  <sup>77, 83, 89, 102</sup> quanto de IL-6.<sup>77, 83</sup> Por outro lado, estudos que realizaram protocolos mais curtos de dietas hipercalóricas não encontraram efeito no que se refere a aumento da produção de citocinas no tecido adiposo.<sup>82, 84, 92</sup> Em conjunto, tais resultados sugerem que a inflamação é uma resposta à exposição crônica ao excesso de nutrientes.

A análise de macrófagos isolados sugere que a grelina modula a produção de TNF- $\alpha$  nestas células. Por outro lado, em macrófagos *knockdown* para grelina observou-se o aumento da expressão do gene TNF- $\alpha$ .<sup>89</sup> Curiosamente, os camundongos alimentados com HFD apresentaram diminuição da expressão do gene da grelina nos macrófagos peritoneais, enquanto o exercício voluntário reverteu essa alteração.<sup>89</sup>

O papel das populações de leucócitos na inflamação do tecido adiposo induzido por HFD foi relatado por Wasinski e colaboradores e Kawanishi e colaboradores.<sup>77; 93</sup> Tais estudos mostraram que o consumo de HFD aumentou a quantidade de CD8<sup>+</sup> no tecido adiposo dos camundongos.<sup>77, 93</sup> Em apenas um dos estudos houve aumento de CD4<sup>+</sup> no tecido adiposo dos animais que consumiram HFD.<sup>93</sup> Os produtos de células T CD8<sup>+</sup> tais como MCP-1<sup>77, 89</sup> MCP-2,<sup>77</sup> MIP-1,<sup>77</sup> MIP-1 $\beta$ <sup>77</sup> aumentaram em camundongos que consumiram HFD, sugerindo que o consumo de dieta hiperlipídica pode promover a inflamação por ativação de resposta de imunidade adaptativa macrofágica. Esta resposta inflamatória é diminuída quando o consumo de dieta hipercalórica é associado à realização de exercício físico.<sup>77, 82, 83, 89</sup>

Além do tecido adiposo, o excesso de consumo de nutrientes aumentou os marcadores inflamatórios no plasma<sup>80, 93</sup> e no fígado<sup>68, 76</sup> dos camundongos. Os estudos mostraram que protocolos de natação<sup>93</sup> e esteira<sup>76, 68, 80</sup> reverteram o estado inflamatório nesses tecidos.

Adiponectina,<sup>102</sup> um fator anti-inflamatório, e seu receptor ADIPOR1<sup>88</sup> estão diminuídos no tecido adiposo de camundongos alimentados com HFD. Mesmo na manutenção da dieta hipercalórica, a instituição de um protocolo de natação aumentou a expressão desse hormônio derivado do tecido adiposo,<sup>102</sup> sugerindo um potencial papel do exercício na ativação de vias anti-inflamatórias.

Em resumo, HFDs induzem a inflamação ativando a imunidade inata (macrófagos) e adaptativa (linfócitos). A resposta imune induz a produção de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, a atividade anti-inflamatória é prejudicada pelo consumo excessivo de nutrientes. Nessa condição, os protocolos de corrida em esteira motorizada,<sup>68, 76, 78, 77, 80, 83, 84</sup> natação<sup>93, 102</sup> e exercício voluntário<sup>89</sup> atuam reduzindo esta condição inflamatória.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar os efeitos metabólicos sistêmicos e hepáticos decorrentes de um protocolo de natação de baixa intensidade em um modelo murino-dietético de DHGNA associada à SMet.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar alterações do metabolismo glicêmico decorrentes de um protocolo de natação em um modelo murino-dietético de DHGNA associada à SMet ;
- Investigar as modificações no fenótipo biométrico decorrentes da submissão a um protocolo de natação em camundongos C57Bl/6 induzidos à síndrome metabólica por dieta hiperlipídica;
- Avaliar as modificações no perfil lipídico plasmático, hepático e em fezes de camundongos com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica submetidos a um protocolo de natação;
- Avaliar os efeitos da intervenção dietética e do protocolo de natação proposto sobre a estrutura morfológica do fígado de camundongos C57Bl/6;

- Investigar a presença de dano hepático por meio da quantificação de marcadores plasmáticos em camundongos C57Bl/6 com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos à natação;
- Investigar a expressão de genes lipogênicos e de proteínas transportadoras de produtos lipídicos no fígado de camundongos C57Bl/6 com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos à natação.
- Analisar a atividade de enzimas antioxidantes no fígado de camundongos C57Bl/6 com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos à natação.
- Avaliar a expressão de genes pró-inflamatórios no fígado de camundongos C57Bl/6 com síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica e submetidos à natação.

#### 4. MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental desenvolvido no Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC) (Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas (ICBS/UFAL), em parceria com o Max Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC). A pesquisa foi desenvolvida dentro dos preceitos éticos para a experimentação animal, sendo aprovada pela Comissão de Ética no Uso de animais da UFAL (protocolo 63/2015, Anexo A).

##### 4.1 Animais

Camundongos C57Bl/6 foram obtidos no Biotério Central da UFAL com idade entre 4 e 6 semanas e mantidos no Biotério setorial do Laboratório de Reatividade Cardiovascular/ICBS sob temperatura ambiente constante de  $23\pm 2$  °C, ciclo claro/escuro de 12h e acesso livre a água.

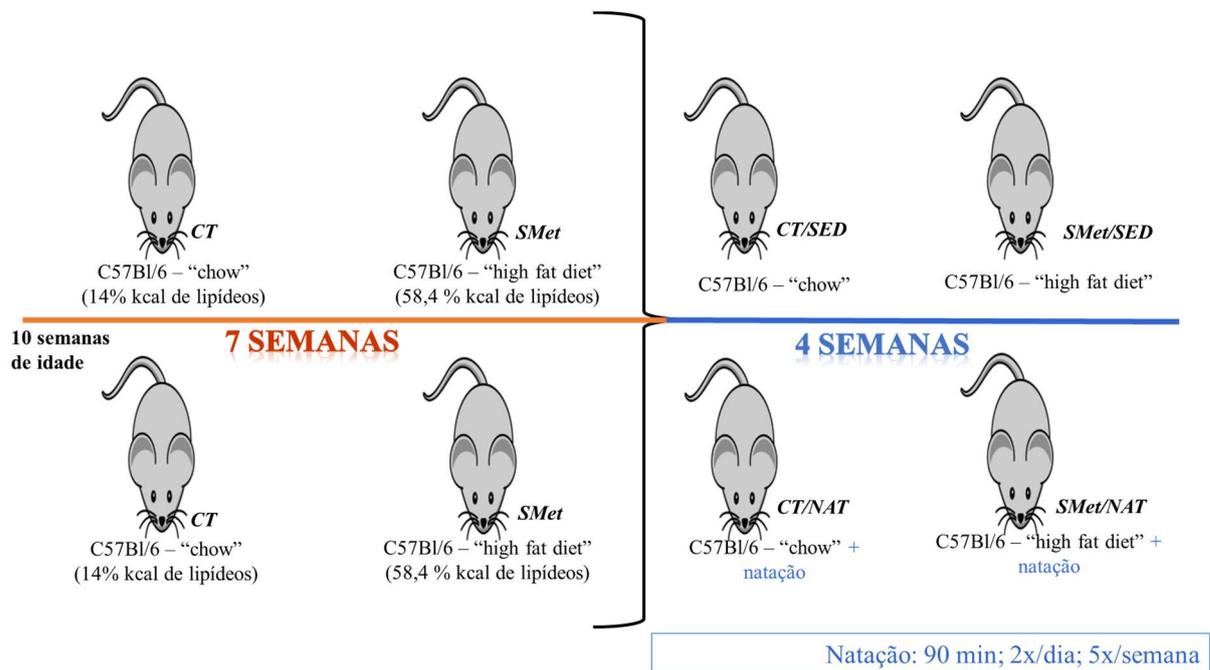
Os animais foram alocados em gaiolas apropriadas para experimentação animal. Cada gaiola recebeu no máximo 6 animais. A alimentação foi ofertada *ad libitum*. Inicialmente todos os animais consumiram água mineral e dieta padrão de composição nutricional adequada à espécie (Nuvilab<sup>®</sup> CR-1, Paraná, Brasil, – 14% de kcal provenientes de lipídios). Durante 15 dias ingeriram solução de ivermectina ( $0,007$  mg.mL<sup>-1</sup>) na água de beber<sup>121</sup>, além disso, as gaiolas foram borrifadas diariamente com a mesma solução diluída 1:100. O tratamento com ivermectina objetiva profilaxia antiparasitária.

## 4.2 Delineamento experimental

Após esse período de quarentena, os animais (8-10 semanas de idade) foram randomicamente divididos em quatro grupos experimentais e identificados por marcação na orelha. Dois grupos continuaram a consumir dieta padrão “Chow” (Nuvilab® CR-1, Paraná, Brasil, – 14% de kcal provenientes de lipídios), os quais foram denominados grupos controle (CT), enquanto outros dois grupos passaram a consumir dieta hiperlipídica “HFD” (58,4% de kcal provenientes de lipídios),<sup>122</sup> estes foram denominados grupos “síndrome metabólica” (SMet). Após 7 semanas do início da intervenção dietética, os animais iniciaram o período de tratamento com exercício físico, dessa forma, estabeleceram-se quatro grupos:

1. Grupo controle sedentário (CT/SED; n=5)
2. Grupo controle + natação (CT/NAT; n=6)
3. Grupo Síndrome metabólica sedentário (SMet/SED; n=5)
4. Grupo Síndrome metabólica + natação (SMet/ NAT; n=6)

**Figura 3 - Delineamento experimental.**



Fonte: imagem adaptada de Huang, et al. Whole-Body vibration training effect on physical performance and obesity in mice. *Int. J. Med. Sci.* 2014; 11(12): 1218-1227.

## 4.3 Acompanhamento animal

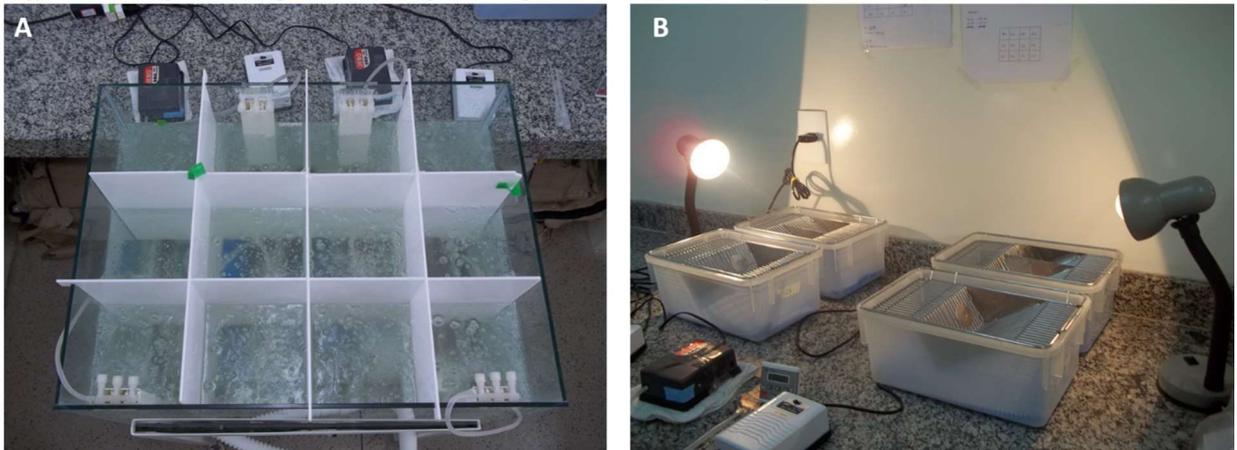
Durante todo o período experimental, os animais foram pesados semanalmente em balança semi-analítica. As ingestões sólida e líquida foram pesadas semanalmente em horário

padronizado às 17h. Para estimar o consumo diário de cada animal utilizou-se a seguinte fórmula:  $((\text{peso da oferta} - \text{peso da sobra}) / \text{número de dias entre as pesagens}) / \text{número de animais na gaiola}$ . A glicemia foi medida a cada 15 dias por coleta de gotícula de sangue na veia caudal e mensuração em glicômetro.

#### 4.4 Protocolo de natação

Os animais dos grupos natação nadaram em um tanque de vidro com área de 60 cm x 45cm e 40 cm de profundidade<sup>a</sup>. O aparato (**Figura 4A**) foi dividido em 12 raiais individuais com área de superfície de 225cm<sup>2</sup>. Um sistema de borbulhamento foi utilizado para evitar o comportamento de flutuação durante as sessões de treinamento. Tal sistema foi composto por bombas de ar conectadas a mangueiras com pedra-pomes na extremidade, as quais ficavam submersas em cada raia. A temperatura da água foi mantida entre 30°C e 32°C e monitorada durante o treinamento dos animais por um termômetro de coluna de mercúrio. Diariamente o tanque foi higienizado e toda a água trocada.

**Figura 4 - Aparatos para execução do protocolo de natação**



**Fonte:** acervo pessoal. A: tanque de natação com raiais individuais; B: esquema de secagem com lâmpadas incandescentes.

O protocolo de natação foi adaptado de Evangelista et al.<sup>58</sup> A **figura 5** é representativa do cronograma de treinamento empregado. Os animais nadaram por 4 semanas, cinco dias por semana, duas vezes ao dia, iniciando à primeira sessão de treinamento às 11:30h e a segunda às 16:30h. O intervalo entre as sessões de treino foi de 3 horas e 30 minutos. Após cada sessão, os animais foram cuidadosamente secos e colocados em gaiolas forradas com papel absorvente e mantidos sob luz incandescente por 20 minutos (**Figura 4B**). Na sequência, os camundongos foram colocados de volta às gaiolas de origem. O protocolo

teve início com 20 minutos de natação por sessão. A cada dia foram acrescidos 10 minutos até que foram alcançados 90 minutos. A partir desse dia, os animais mantiveram o tempo de natação até o final do protocolo. Quarta-feira e domingo foram eleitos os dias de descanso (sem nenhum tipo exercício forçado).

Os camundongos dos grupos “SED” foram colocados em contato com a água por 5 minutos nos mesmos horários em que os grupos “NAT” executaram o protocolo de exercício físico. Tal procedimento foi empregado para que todos os animais em experimentação passassem pelo stress aquático.

**Figura 5 - Calendário do protocolo de natação**

Sem. 1	Segunda Adaptação (20 min)	Terça Adaptação (30 min)	Quinta Adaptação (40 min)	Sexta Adaptação (50 min)	Sábado Adaptação (60 min)
Sem. 2	Segunda Adaptação (70 min)	Terça Adaptação (80 min)	Quinta Adaptação (90 min)	Sexta Treino	Sábado Treino
Sem. 3	Segunda Treino	Terça Treino	Quinta Treino	Sexta Treino	Sábado Treino
Sem. 4	Segunda Treino	Terça Treino	Quinta Treino	Sexta Treino	Sábado Treino

Fonte: elaborada pela doutoranda.

## 4.5 Testes Metabólicos

### 4.5.1 Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum de 12h. Imediatamente antes do teste, os animais foram pesados e foi medida a glicemia de jejum por meio da coleta de 1 gota de sangue a partir da veia caudal. Para tanto, fez-se um pequeno corte na cauda do animal e foi realizada a drenagem de sangue manualmente. A amostra de sangue coletada foi analisada por meio de glicômetro. Em seguida, injetou-se 2g glicose.kg<sup>-1</sup> via intraperitoneal (Glicose, Merck®, Darmstadt, Alemanha). Após a injeção de glicose, a glicemia foi mensurada em 15, 30, 60, 90 and 120 minutos com glicômetro.<sup>123</sup>

### 4.5.2 Teste de resistência à insulina

O teste de resistência à insulina foi realizado com os animais em estado alimentado. Imediatamente antes do teste, os animais foram pesados e mediu-se a glicemia por meio da

coleta de 1 gota de sangue a partir da veia caudal. Para tanto, fez-se um pequeno corte na cauda do animal e foi realizada a drenagem de sangue manualmente. A amostra de sangue coletada foi analisada por meio de glicosímetro. Em seguida, injetou-se 0,75 unidades de insulina.kg<sup>-1</sup> via intraperitoneal (Huminsulin<sup>®</sup>, Lilly, Indianapolis, IN). Após a injeção de insulina, a glicemia foi mensurada em 15, 30, 60, 90 and 120 minutos com glicosímetro.<sup>123</sup>

#### 4.6 Cálculo dos índices HOMA-IR, HOMA-β e Tyg

A partir dos dados de glicemia de jejum obtidos no tempo zero do teste de tolerância à glicose e da dosagem da concentração de insulina plasmática em jejum, procedeu-se os cálculos do índice de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) e do índice de avaliação da homeostase das células β-pancreáticas (HOMA-β) Foram empregadas as seguintes equações<sup>124</sup>:

- $HOMA-IR = (glicemia\ de\ jejum \times insulina\ de\ jejum) / 22,5$
- $HOMA-\beta = (20 \times insulina\ de\ jejum) / (glicemia\ de\ jejum - 3,5)$

O índice do produto de triglicerídeos e glicemia de jejum (Tyg) é considerado um instrumento útil na identificação de resistência à insulina<sup>125</sup>. O cálculo do Tyg foi feito com base na concentração plasmática de triglicerídeos em jejum de 12 – 15h e glicemia de jejum obtida no tempo zero do teste de tolerância à glicose. Foi empregada a seguinte equação<sup>125</sup>:

- $Tyg = Ln[triglicerídeos\ de\ jejum\ (mg/dL) \times glicemia\ de\ jejum\ (mg/dL)/2]$

#### 4.7 Eutanásia dos animais

Após o encerramento do protocolo experimental, procedeu-se com à eutanásia dos animais atendendo aos princípios éticos estabelecidos pela Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos.<sup>126</sup>

Após jejum de 12 horas, mensurou-se à glicemia a partir de uma gota de sangue coletada na cauda do animal. Em seguida, pesou-se os animais em balança semi-analítica. Os animais foram anestesiados com associação de cloridato de cetamina 10% (Syntec<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (Syntec<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) (0,5 mL de Xilazina + 1 mL de Ketamina + 8,5 mL de solução salina), utilizou-se a injeção de 0,01 mL.g<sup>-1</sup> de peso corporal. Uma vez anestesiados, foram feitas medidas do comprimento céfalo-anal e da circunferência abdominal.

A efetividade da anestesia foi estabelecida por meio de prensão nas patas dos animais. Quando detectada ausência de resposta ao estímulo doloroso, iniciou-se o

procedimento cirúrgico. Através de uma pequena incisão abaixo do processo xifoide, introduziu-se uma agulha (0,70 x 25mm, 22G x 1”) no ventrículo direito para punção do sangue total do animal via seringa de 1 mL. Em seguida, perfundi-se o animal com ~1mL de solução antioxidante para evitar a oxidação dos tecidos e ~1mL de solução de heparina para cada 30 g de peso animal, no intuito de impedir a coagulação de resíduos de sangue nos tecidos. Na sequência, realizou-se incisão maior para expor os órgãos do tórax e abdome. Os seguintes órgãos foram dissecados: cérebro, coração, pulmão, fígado, intestino, tecido adiposo (perirrenal, mesentérico e epididimal), TAM, baço, rins, músculo sóleo, músculo gastrocnêmio e tibia. Todos os tecidos foram pesados em balança semi-analítica, com exceção da tibia que foi medida com o auxílio de um paquímetro. Após a pesagem dos órgãos, estes foram imediatamente armazenados em freezer a -80°C. Além dos órgãos, durante a dissecação do intestino, foram coletadas as fezes do colo descendente e sigmoide. Estas foram armazenadas a -20°C.

O sangue coletado na punção cardíaca foi mantido em banho de gelo e em sequência centrifugado em centrífuga refrigerada a 4°C, 4000 rpm por 10 minutos. O plasma foi separado dos eritrócitos e armazenado em alíquotas, sendo estas mantidas em biofreezer a -80°C para dosagens futuras.

#### **4.8 Cálculo da massa relativa dos tecidos e índice de adiposidade**

Para a avaliação da composição corporal dos animais, calculou-se a massa de cada tecido em relação ao comprimento da tibia.<sup>123</sup> Para tanto, imediatamente após a eutanásia, os órgãos foram dissecados e os tecidos pesados em balança semi-analítica. O cálculo da massa relativa do tecido foi feito dividindo-se a massa do tecido em gramas pelo comprimento da tibia em milímetros e multiplicando-se o resultado por 100.<sup>123</sup> Dessa forma, obtém-se o percentual da massa corporal correspondente a cada tecido normalizado pela tibia.

O índice de adiposidade é representativo do conteúdo corporal de tecido adiposo branco.<sup>123</sup> Seu cálculo é feito pela divisão da massa de tecido adiposo branco (perirrenal, epididimal e mesentérico) em gramas pela massa corporal total em gramas, o resultado é multiplicado por 100 para obtenção do percentual.

#### **4.9 Extração de lipídios totais**

A extração de lipídios foi realizada em amostras de fígado e fezes segundo o método de Folch.<sup>127</sup> Para separação dos lipídios, cada amostra foi homogeneizada em solução de clorofórmio:metanol (2:1) na proporção 1:20 até que o mesmo estivesse completamente

fragmentado. Foram adicionados 400µL de metanol a cada amostra e centrifugado a temperatura ambiente a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e transferido para tubo de ensaio previamente pesado em balança analítica. Em seguida acrescentou-se 800 µL de clorofórmio e 640 µL de NaCl 0,73%. Novamente a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, a fase superior foi desprezada, deixando o anel de lipídios formado na superfície. Em sequência foram feitas três lavagens com “Solução de Folch”, cada uma seguida de centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e remoção da fase superior. O tubo de ensaio foi coberto com papel alumínio fenestrado e mantido em estufa à 37°C até a secagem da fase líquida (cerca de 48h).

Após a secagem, aguardou-se os tubos arrefecerem para posterior limpeza manual com clorofórmio para remover possíveis fragmentos de tecido ou fezes das paredes laterais dos tubos que foram novamente pesados na mesma balança analítica para quantificar a massa de lipídios extraída. Estes foram suspensos em 500 µL de isopropanol, transferidos para tubos de 1,5 mL, os quais foram armazenados a -20°C até as dosagens de colesterol, triglicérides e ácidos graxos não-esterificados (AGNE).

#### **4.10 Obtenção de homogenato hepático**

Triturou-se o tecido hepático em tampão de lise celular “radioimmunoprecipitation assay buffer” (RIPA) na proporção 1:10 até a homogeneização. Em sequência, os tubos tipo falcon contendo o material homogeneizado foram colocados imersos em água em cuba ultrassônica por 20 segundos. As amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dividido em alíquotas para as dosagens bioquímicas e mensuração de atividade enzimática.

#### **4.11 Dosagens bioquímicas em microplaca**

##### **4.11.1 Colesterol e Triglicérides**

Para dosar colesterol total e triglicérides utilizou-se “kits” comerciais (Labtest<sup>®</sup>, Minas Gerais, Brasil) por análise colorimétrica: Colesterol Liquiform<sup>®</sup> e Triglicérides Liquiform<sup>®</sup>. As amostras de fezes, fígado e plasma foram diluídas em água milliQ na proporção 1:20, 1:20 e 1:50, respectivamente. Utilizando-se o reagente padrão do “kit”, construiu-se curva de diluição com concentrações conhecidas dos lipídios a serem dosados. Em microplaca, foram adicionados 100 µL da curva padrão e das amostras de concentrações desconhecidas, todas em duplicatas. Em seguida, adicionou-se 100µL do reagente cromógeno.

Após 10 a 15 minutos de incubação a 37°C, determinou-se à absorvância em comprimento de onda de 492nm em leitor para microplaca. A análise dos dados foi realizada a partir do cálculo da equação da curva padrão cuja concentração de substrato variou entre 1,0 mg.dL<sup>-1</sup> e 12,0 mg.dL<sup>-1</sup>.

#### 4.11.2 Cálculo da concentração de VLDL

A partir dos dados obtidos na dosagem descrita no item 4.10.1, procedeu-se o cálculo da concentração de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C) que consiste no produto da concentração de triglicerídeos plasmáticos por 0,20.<sup>128</sup>

#### 4.11.3 Ácidos graxos não-esterificados

A quantificação de AGNE nas amostras de lipídios extraídos do fígado ou plasma foi realizada por método enzimático colorimétrico com “kit” comercial Wako® (Chemicals GmbH®, Hamburgo, Alemanha). Seguiu-se as especificações do fabricante com adaptações realizadas pelo nosso grupo. Para tanto, foram utilizados 5µL de amostras (plasma ou lipídios diluídos em isopropanol). Após as reações em microplaca, à leitura foi realizada com comprimento de onda de 546nm e 600nm em leitor de microplaca.

O método enzimático para dosagem de AGNE baseia-se na acilação da coenzima-A (CoA) pelos ácidos graxos na presença de acil-CoA sintetase<sup>129</sup>. A acil-CoA produzida é oxidada pela adição de acil-CoA oxidase com geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que na presença de peroxidase permite a condensação oxidativa de 3-metil-N-etil-N-(β-hidroxi-*etil*)-anilina com 4-aminoantipirina para formar a cor de púrpura que pode ser medida colorimetricamente <sup>129</sup>.

#### 4.11.4 Marcadores de dano hepático

Para a mensuração dos níveis de ALT e AST utilizou-se “kit” comercial (Labtest®, Minas Gerais, Brasil). Foram diluídos 25µL de plasma em tampão fosfato-salino (PBS) na proporção 1:4. Adicionou-se 20 µL da amostra diluída em cada poço da microplaca e em sequência acrescentou-se o reagente de trabalho.

Para a dosagem de ALT foram feitas leituras no leitor de microplacas nos tempos 0, 1', 2' e 5' com comprimento de onda de 340nm. Para a leitura da placa de AST utilizou-se comprimento de onda de 505nm nos tempos 0, 5', 10' e 15'. Durante o processo de leitura as placas ficaram encubadas a 37°C.

A partir dos dados obtidos nas dosagens, obteve-se a razão AST/ALT para investigação da progressão da DHGNA, uma vez que este cálculo é um marcador de fibrose e cirrose hepáticas.<sup>130</sup>

#### 4.11.5 Mensuração da atividade da superóxido dismutase (SOD) no tecido hepático

Para mensurar a atividade da SOD, utilizou-se homogenato hepático diluído em PBS 0,01M na proporção 1:100. Utilizou-se o *kit* comercial Sigma® conforme instruções do fabricante. O método é baseado na 46licocorticoie um sal hidrosolúvel, o WST-1 (2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazólio, sal monossódico), que é reduzido pelo ânion radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). O produto desta reação é o cromógeno “formazana”. A taxa de redução é linearmente relacionada à atividade da enzima xantina oxidase (XO) que, por sua vez, é inibida pela SOD. A leitura foi realizada em leitor de microplaca no comprimento de onda de 450 nm. Os dados foram normalizados pela concentração de proteínas totais no tecido.

#### 4.11.6 Mensuração da atividade da catalase no tecido hepático

Utilizou-se protocolo padronizado no Laboratório de Reatividade Cardiovascular.<sup>131</sup> Diluiu-se 20  $\mu\text{L}$  de homogenato hepático (1:500) em tampão específico. Na sequência, adicionou-se à microplaca. Para início da reação, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Concentração final = 1 mM). Em seguida, uma substância cromógena foi adicionada e o produto reacional foi quantificado em microplaca a 540 nm em leitor de microplaca. Uma curva padrão foi preparada para calcular a concentração da enzima nas amostras. A atividade da catalase foi normalizada pela concentração de proteínas totais no tecido.

### 4.12 Dosagens realizadas por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

As dosagens de insulina e leptina foram realizadas pelo método de ELISA tipo sanduíche utilizando “kits” comerciais (Millipore®, Merck®, Darmstadt, Alemanha), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

ELISA sanduíche baseia-se na seguinte sequência: 1) ligação do composto a ser dosado na amostra a um anti-corpo pré-titulado e imobilização dos complexos resultantes nos poços de uma placa de microtitulação; 2) lavagem dos anticorpos de detecção livres; 3) ligação de peroxidase aos anticorpos imobilizados; 4) lavagem de conjugados enzimáticos livres e 5) quantificação de conjugados anticorpo-enzima monitorizando a atividade da peroxidase na presença do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. A atividade enzimática é mensurada por meio de espectrofotometria com comprimento de onda de 450 nm.<sup>132</sup>

#### 4.13 Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real

Realizou-se a análise de expressão de genes relacionados ao metabolismo e transporte de lipídios no fígado: CD36, aP2, CPT-1 $\alpha$ , FAS, ACC-1, SCD-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , arginase-1 e catalase. Para tanto, extraiu-se RNA das amostras de fígado (~50mg) com 1mL do reagente Trizol® (Ambion, Life Technologies Corporation) e trituração através de agitação em alta velocidade (FastPrep®24) por 40 segundos. Quantificou-se o RNA no comprimento de onda de 260nm (NanoDrop, Munchen, Germany); e nos comprimentos de onda 230nm e 280nm para avaliar o grau de pureza das amostras. A relação entre as absorvâncias obtidas em 260/280 avaliou a contaminação com proteína e em 260/230 a contaminação com fenol. O resultado de ambas ficou dentro dos valores aceitáveis (entre 1,8 - 2,2). O RNA total foi tratado com a enzima DNAase (Promega®) e transcrito a DNA complementar (cDNA) utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Reverse Transcriptase – Invitrogen®). Diluiu-se o cDNA para concentração final de 2,5ng/uL e, na sequência, amplificou-se usando a enzima Taq polimerase (GoTaq qPCR Master Mix, Promega®) por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (Applied Biosystems QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System). Quantificou-se o RNA como um valor relativo em comparação com uma referência interna, o GAPDH. Obteve-se a análise da expressão pela elevação negativa do  $\Delta\Delta Ct$  (“threshold cycle”) na base 2 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )<sup>133</sup>. Os “primers” utilizados são os descritos no **quadro 2**.

**Quadro 2 - “Primers” utilizados para a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real em amostras de fígado.**

Primer	Foward	Reverse
<b>CD36</b>	CATGTAGGAAATGTGGAAGCGA	TCTTCCAGCCAATGCCTTTG
<b>aP2</b>	GTTGAGGATGGTGTCCACGTAC	GTATGCCATGTGTGACCGGAG
<b>CPT-1<math>\alpha</math></b>	CTCCGCCTGAGCCATGAAG	CACCAGTGATGATGCCATTCT
<b>FAS</b>	GAGGACACTCAAGTGGCTGA	GTGAGGTTGCTGTCGTCTGT
<b>ACC-1</b>	GCCTCTTCCTGACAAACGAG	TGACTGCCGAAACATCTCTG
<b>SCD-1</b>	TTCTTACACGACCACCACCA	CCGAAGAGGCAGGTGTAGAG
<b>GAPDH</b>	CCATCACCATCTTCCAGGAG	GTGGTTCACACCCATCACAA
<b>Arginase 1</b>	GACACAGGTTGCCATGCAGA	AAGAGCTGGCTGGTGTGGTG
<b>Catalase</b>	CACGCTGGTAGTTGGCCACT	GCCCAGCCCTGACAAAATGC
<b>IL-6</b>	AACCACGGCCTTCCCTACTT	CCATTGCACAACTCTTTTCTCATT
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	GTCTACTGAACTTCGGGGTGA	CTCCTCCACTTGGTGGTTTG

#### 4.14 Processamento histológico

Durante à eutanásia, o fígado dos animais foi dissecado, lobo quadrado rebatido e imediatamente imerso em solução de formalina a 10% com volume da solução 10 vezes maior do que o tamanho do fragmento. Após 12 horas o tecido foi lavado em água corrente e mantido em banho de etanol 70% até o processamento final. Durante tal período, a solução de etanol foi renovada a cada uma semana. A partir do processo de desidratação foi cortado um fragmento do tecido de, aproximadamente, 5 mm a partir da extremidade distal do lobo hepático. Em sequência foi realizada a seguinte sequência de banhos: 30 minutos em etanol 90%, 2 banhos de 30 minutos em etanol 100%, 60 minutos em etanol 100%. Prosseguiu-se o clareamento do tecido com dois banhos de 60 minutos em xilol 100%. A impregnação foi realizada com banhos de parafina a 60 °C por tempos de: 30, 60 e 90 minutos. Em seguida o fragmento de tecido foi incluso em blocos de parafina com a extremidade proximal exposta para corte. Os blocos de parafina foram armazenados em temperatura ambiente.

Para a preparação das lâminas, foram realizados cortes de 3µm em micrótomo digital. Para hidratar o tecido e facilitar os cortes foram utilizados albumina e gelo. Foram realizados três cortes de cada amostra, os quais foram fixados em lâminas de vidro.

Para visualizar a estrutura dos hepatócitos e vesículas de gordura, procedeu-se à coloração com hematoxilina e eosina (HE). Para tanto, procedeu-se a seguinte sequência de banhos: (1) 3 banhos de 5 minutos em xilol 100%, (2) 3 banhos de 5 minutos em etanol 100%, (3) 5 minutos em etanol 95%, 80%, 70% e 50%, (4) 5 minutos em água destilada, (5) 3 minutos em Hematoxilina, (6) 15 minutos em água destilada, (7) 30 segundos em eosina, (8) 5 minutos em água destilada, (9) 5 minutos em etanol 50%, 70%, 80%, 95% e 100%, (10) 3 banhos de 5 minutos em xilol.

Obtivemos fotos histológicas a partir do microscópio óptico. Para cada corte foram feitas fotos com as lentes objetivas 4x/0,10 (∞/ - / FN22), 10x/0,25 (∞/ - / FN22) e 40x/0,65 (∞/ 0,17 / FN22). O campo para captura da imagem foi estabelecido com a identificação da tríade hepática (veia porta hepática, artéria hepática e ducto biliar).

#### 4.15 Equipamentos

Segue-se abaixo a descrição e especificações dos equipamentos utilizados e citados nos itens anteriores:

- Balança analítica Shimadzu AUX 120 (Shimadzu®, São Paulo, Brasil) com capacidade de pesagem de até 120g e leitura de 0,1mg.

- Balança semi-analítica Shimadzu BL 220H (Shimadzu®, São Paulo, Brasil) com capacidade de pesagem de até 220g e leitura de 0,001g – balança utilizada para a pesagem dos tecidos obtidos durante a eutanásia dos camundongos.
- Balança semi-analítica Shimadzu BL 320S (Shimadzu®, São Paulo, Brasil) com capacidade de pesagem de até 320g e leitura de 0,01g.
- Centrífuga refrigerada (Modelo 5430; Eppendorf®, Brasil).
- Cuba ultrassônica (Caso®, Alemanha)
- Glicosímetro (Accu Chek Performa, Roche®, Brasil).
- Leitor para microplaca Multi Skan Go® (Thermo Scientific®, Software 2.4, Vantaa, Finlândia)
- Microscópio óptico Olympus® BX51 (Olympus®, Tóquio, Japão)
- Micrótomo digital (Leica Biosystems®, Estados Unidos)

#### 4.16 Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos durante o estudo foram analisados no software GraphPad Prism® versão 5.0 para Windows® (GraphPad® Software, Califórnia, Estados Unidos). Para a comparação de dados coletados transversalmente entre grupos utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) uma via com pós-teste de *Bonferroni* para a comparação de todos os pares de grupos. Para a análise de dados coletados longitudinalmente, utilizou-se o teste ANOVA duas vias com pós-teste de *Bonferroni* para a comparação de todos os pares de grupos. Quando não foi possível identificar a diferença estatística, considerando-se a comparação de todos os grupos, realizou-se o teste t para a comparação de pares de grupos. Considerou-se diferença significativa entre os grupos os resultados com p-valor  $\leq 0,05$ .

Para a análise de correlação entre duas variáveis, procedeu-se o teste de “Shapiro-Wilk” para verificar a distribuição de dados. As variáveis que não apresentavam distribuição normal foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman.<sup>44</sup> Quando as duas variáveis a serem correlacionadas atenderam aos pressupostos de normalidade, empregou-se o teste de correlação de Pearson.<sup>44</sup> A categorização da força da correlação foi feita conforme descrito no **quadro 3**.<sup>134</sup>

**Quadro 3 - Interpretação do grau de correlação a partir do cálculo do coeficiente de correlação de Perason ou Spearman**

<b>Coeficiente de correlação</b>	<b>Interpretação</b>
0,9 a 1 (-0,9 a -1)	Correlação positiva (negativa) muito alta
0,7 a 0,89 (-0,7 a -0,89)	Correlação positiva (negativa) alta
0,5 a 0,69 (-0,5 a -0,69)	Correlação positiva (negativa) moderada
0,3 a 0,49 (-0,3 a -0,49)	Correlação positiva (negativa) baixa
0,0 a 0,29 (-0,0 a -0,29)	Correlação positiva (negativa) insignificante

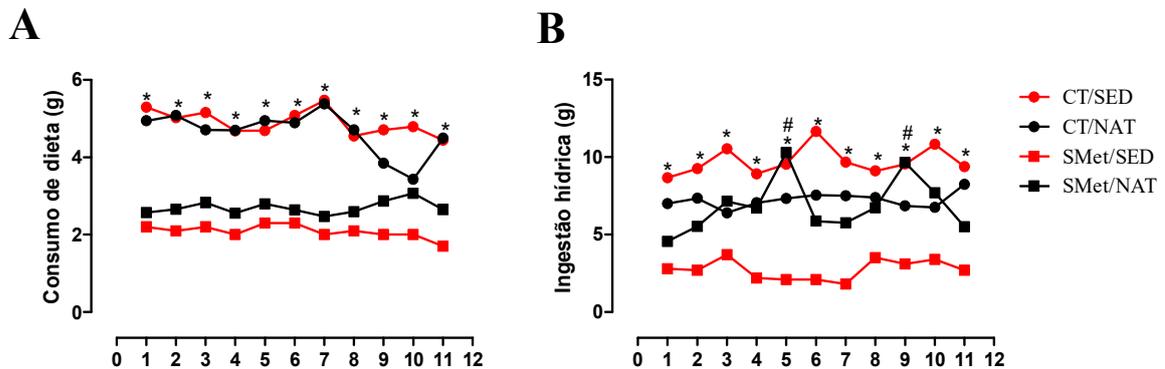
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Consumo de dieta e ingestão hídrica

Os dados de acompanhamento do consumo de dieta e ingestão hídrica (**figuras 6A e 6B**) mostram que os animais dos grupos SMet consomem menor quantidade de dieta em gramas. Este resultado é esperado visto que a dieta HFD é hipercalórica, desta foram mesmo consumindo menor quantidade de dieta, os animais SMet/SED e SMet/NAT consomem mais quilocalorias. Após o início do protocolo de natação, observou-se uma redução numérica no consumo de dieta no grupo CT/NAT. No entanto, não houve diferença estatística e os valores se igualaram ao consumo dietético do grupo CT/SED na última semana de experimentação. Neste estudo, o protocolo de exercício utilizado parece não ter efeito sobre o consumo alimentar dos animais.

Os camundongos do grupo SMet/SED consumiram menor quantidade de água ao longo de todo protocolo experimental quando comparado com os demais grupos (**Figura 6B**). Por outro lado, animais do grupo SMet/NAT, que também consumiram dieta HFD, apresentaram maior ingestão hídrica que seus controles sedentários, assemelhando-se ao consumo de água dos grupos controles.

**Figura 6 - Consumo de dieta e ingestão hídrica de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**

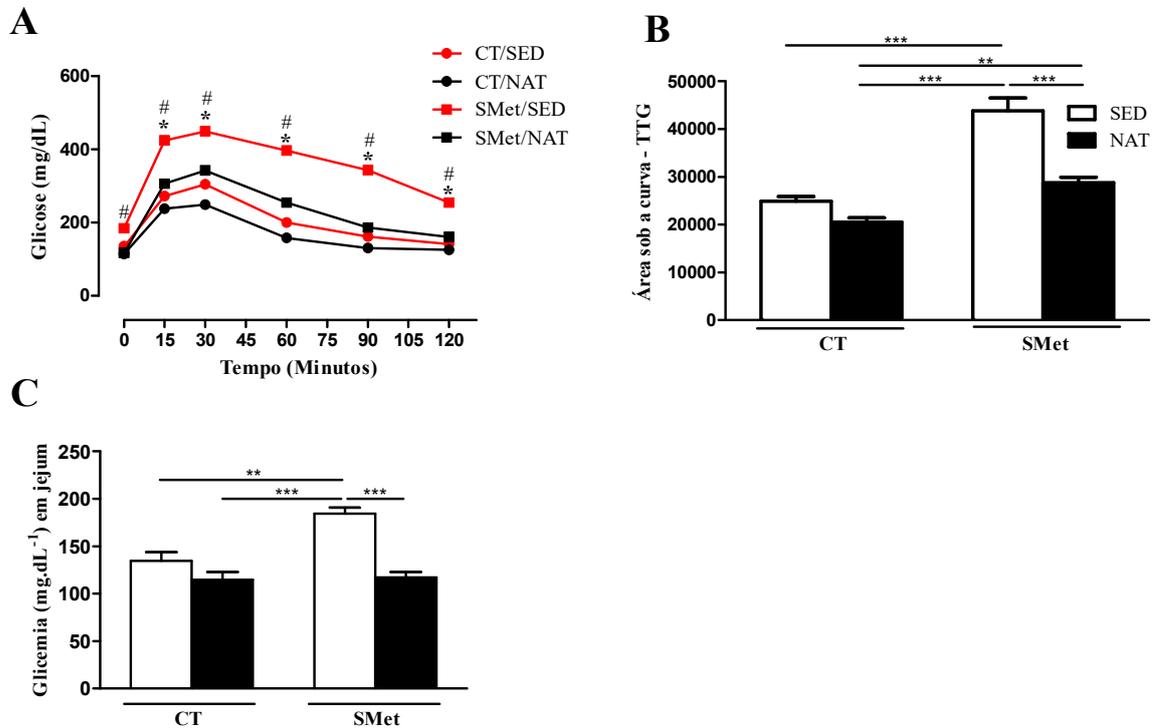


**A:** consumo de dieta por dia por animal; **B:** consumo de água em gramas por dia por animal. CT-grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. Gráfico A: ANOVA duas vias - \* $p \leq 0,05$  comparando Smet/SED com CT/SED; # $p \leq 0,05$  comparando SMet/SED com SMet/NAT.

## 5.2 Metabolismo glicêmico

O teste de tolerância à glicose revelou que o tratamento com natação foi eficaz em aumentar a tolerância à glicose em animais que consumiram a dieta HFD (**Figura 7A**). Os animais que consumiram a dieta hipercalórica, mas mantiveram-se sedentários (SMet/SED) apresentaram glicemia basal maior do que os demais grupos, conforme observado nas **figuras 7A e 7C**, elevando-se pronunciadamente após a injeção intraperitoneal de glicose. Neste grupo, a glicemia manteve-se elevada ao longo dos 120 minutos de teste quando comparada aos demais grupos, sugerindo que animais que consomem dieta hiperlipídica e mantem-se sedentários tem uma diminuição da captação de glicose pelos tecidos (**Figura 7A e 7B**). Por outro lado, os animais que consumiram a dieta HFD, mas realizaram o protocolo de natação, tiveram perfil glicêmico durante o TTG semelhante aqueles que consumiram dieta “chow”.

**Figura 7 - Tolerância à glicose de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



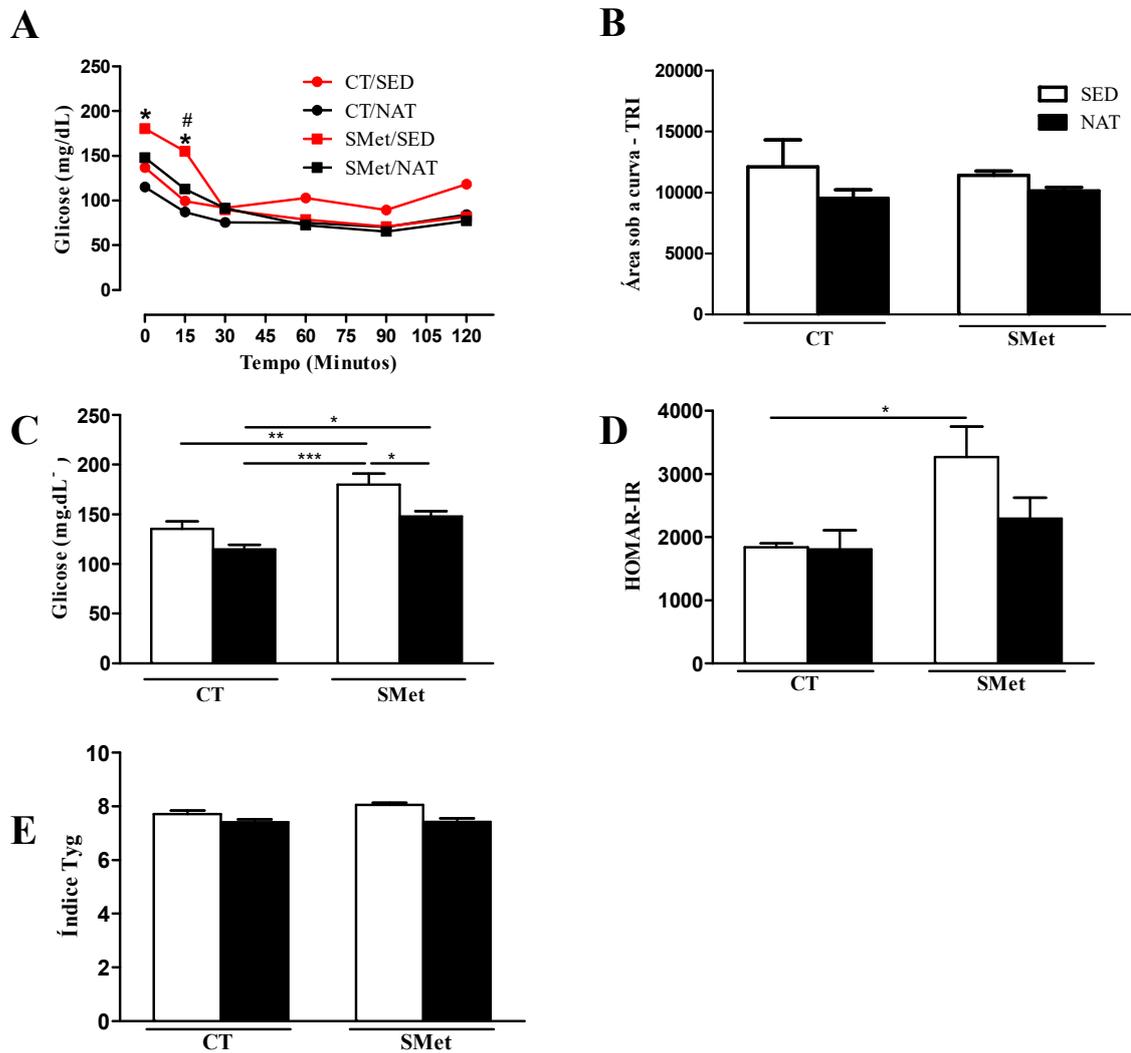
**A:** teste de tolerância à glicose; **B:** cálculo da área sob a curva do teste de tolerância à glicose; **C:** glicemia após jejum de 12 horas. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. Gráfico A: ANOVA duas vias - \* $p \leq 0,05$  comparando SMet/SED com CT/SED; # $p \leq 0,05$  comparando SMet/SED com SMet/NAT. Gráficos B e C: ANOVA uma via - \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Uma vez que os animais do grupo SMet/SED desenvolvem intolerância à glicose, observou-se aumento tanto na glicemia de jejum como em estado alimentado, conforme demonstrado nas **figuras 7C e 8C**, respectivamente. Mais uma vez, o exercício de natação mostrou-se eficaz em evitar a hiperglicemia induzida por HFD. Ao longo de 120 minutos, a avaliação da resistência à insulina demonstrou manutenção de níveis significativamente mais altos da glicemia do grupo SMet/SED nos tempos 0 e 15 minutos (**Figura 8A**). Embora não seja possível afirmar que os animais sedentários que consumiram dieta HFD desenvolveram resistência à insulina (**Figura 8B**), os resultados sugerem redução na sensibilidade ao hormônio verificada por resposta mais lenta neste grupo no que se refere à redução da glicemia. Os resultados do cálculo do índice do modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina (HOMA-IR) reforçam essa hipótese ao demonstrarem valores numericamente maiores no índice de resistência à insulina no grupo SMet/SED em relação

aos demais grupos (**Figura 8D**). Por outro lado, não houve diferença entre os grupos quanto ao índice do produto de triglicerídeos e glicemia de jejum (Tyg) (**Figura 8E**).

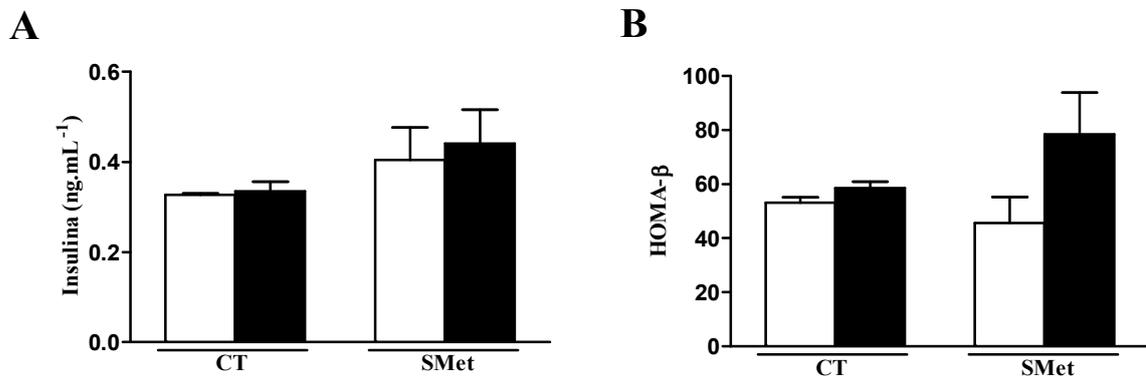
A dosagem de insulina após 12h-15h de jejum (**Figura 9A**), demonstrou que não houve diferença estatística nos níveis plasmáticos de insulina dentre os grupos estudados, o que indica que não houve comprometimento da produção endógena deste hormônio. O índice HOMA- $\beta$ , empregado para estimar a função das células  $\beta$ -pancreáticas, revelou não haver diferença significativa entre os grupos (**Figura 9B**).

**Figura 8 - Resistência à insulina de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



**A:** teste de resistência à insulina; **B:** área sob a curva do teste de resistência à insulina; **C:** glicemia em estado alimentado; **D:** modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina (HOMA-IR); **E:** índice do produto de triglicerídeos e glicemia de jejum (Tyg). CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. Gráfico A: ANOVA duas vias - \* $p \leq 0,05$  comparando Smet/SED com CT/SED; # $p \leq 0,05$  comparando Smet/SED com Smet/NAT. Gráficos B, C e D, E e F: ANOVA uma via - \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

**Figura 9 - Função das células  $\beta$ -pancreáticas de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



**A:** concentração de insulina no plasma; **B:** modelo de avaliação da homeostase de células  $\beta$ -pancreáticas (HOMA- $\beta$ ). CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. ANOVA uma via.

### 5.3 Composição corporal

O acompanhamento da massa corporal dos camundongos em experimentação (**Figura 10A**) demonstrou, a partir da sexta semana de intervenção dietética, um incremento na massa corporal nos animais que consumiram HFD. O grupo SMet/SED apresentou massa corporal significativamente maior do que os demais grupos na segunda e terceira semanas de natação. Na última semana de intervenção não houve diferença estatística entre a massa corporal dos grupos SMet/SED, SMet/NAT e CT/SED no estado alimentado (**Figura 10B**). No entanto, o grupo SMet/SED manteve-se com massa corporal numericamente maior do que os demais (**Figuras 10A e 10B**). Por outro lado, a mensuração da massa corporal em jejum (**Figura 10C**) mostrou diferença significativa entre o grupo SMet/SED e os demais. Avaliando-se a variação da massa corporal dos camundongos, observou-se que os dois grupos que realizaram o protocolo de natação tiveram diminuição do peso corporal durante o período de treinamento (**Tabela 1**). Tal resultado era esperado, uma vez que a partir do momento em que os animais iniciam o protocolo de natação há um aumento da demanda energética, dessa forma, utiliza-se as reservas de gordura reduzindo a massa corporal total.

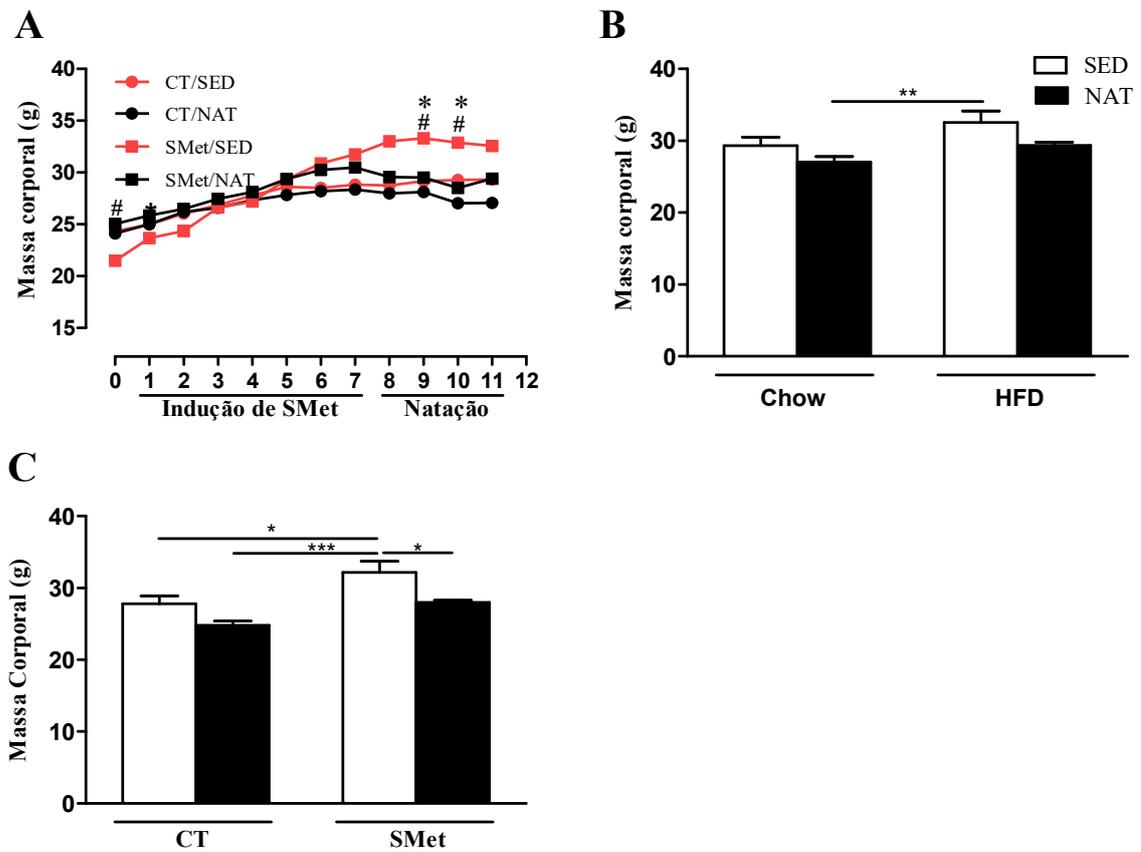
Não houve diferenças nos demais parâmetros biométricos (comprimento da tíbia, comprimento céfalo-anal e circunferência abdominal) avaliados, sugerindo que a intervenção dietética e o treinamento de natação não interferiram no desenvolvimento dos camundongos (**Tabela 1**). Por outro lado, verificou-se que o consumo de HFD por animais sedentários resultou em diminuição da massa tecidual total do fígado, intestino e coração (**Tabela 1**), o

que não ocorreu nos animais do grupo SMet/NAT. Tal resultado sugere modificações teciduais associadas ao consumo de HDF, no entanto para identificar as causas da redução da massa tecidual total, fazem-se necessárias análises morfológicas dos tecidos. Nesta tese será mantido o foco no tecido hepática que é o objeto de estudo.

O cálculo do índice de adiposidade (**Figura 11A**) mostrou que o tecido que contribui para a composição corporal diferiu significativamente entre os grupos. A concentração de leptina no plasma dos animais do grupo SMet/SED foi estatisticamente maior quando comparados aos demais grupos (**Figura 11B**). Os dados são coerentes ao índice de adiposidade apresentado pelos animais do grupo SMet/SED. Conforme esperado, a análise de correlação (**Figura 11C**) mostrou que existe uma forte correlação positiva entre o índice de adiposidade e a concentração plasmática de leptina ( $R = 0,93$ ;  $P < 0,0001$ ).

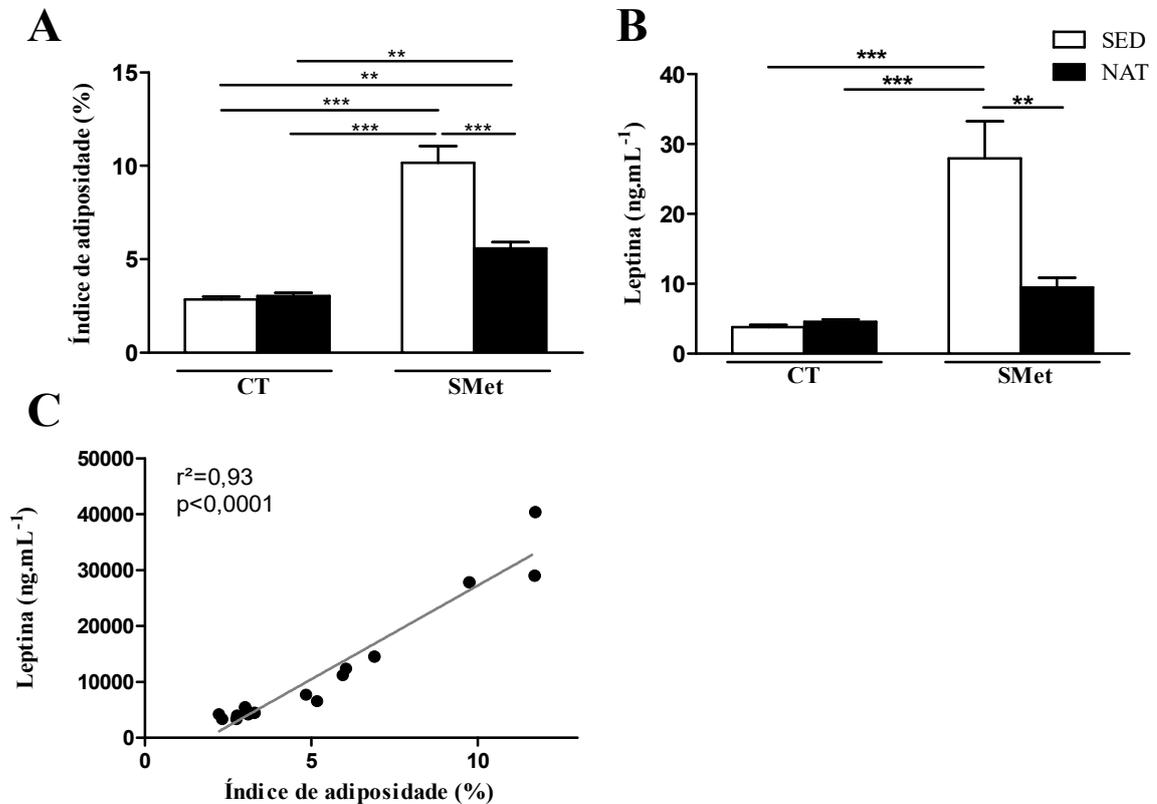
Os animais do grupo SMet/SED apresentaram conteúdo de gordura corporal maior em todos os depósitos corporais de tecido adiposo branco (perirrenal, epididimal e mesentérico) (**Figuras 12A, 12B e 12C**) quando comparados aos demais grupos. Dessa forma, na ausência de exercício, os animais que ingeriram dieta hipercalórica apresentaram aumento da massa corporal total determinado por elevação na deposição de gordura nos sítios do tecido adiposo branco. Sob outra perspectiva, identificou-se aumento na massa de TAM apenas nos animais no grupo CT/NAT (**Figura 12D**). Tal achado indica que o protocolo de exercício modula o TAM, mas este efeito é suprimido pelo consumo de HDF.

**Figura 10 - Massa corporal de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



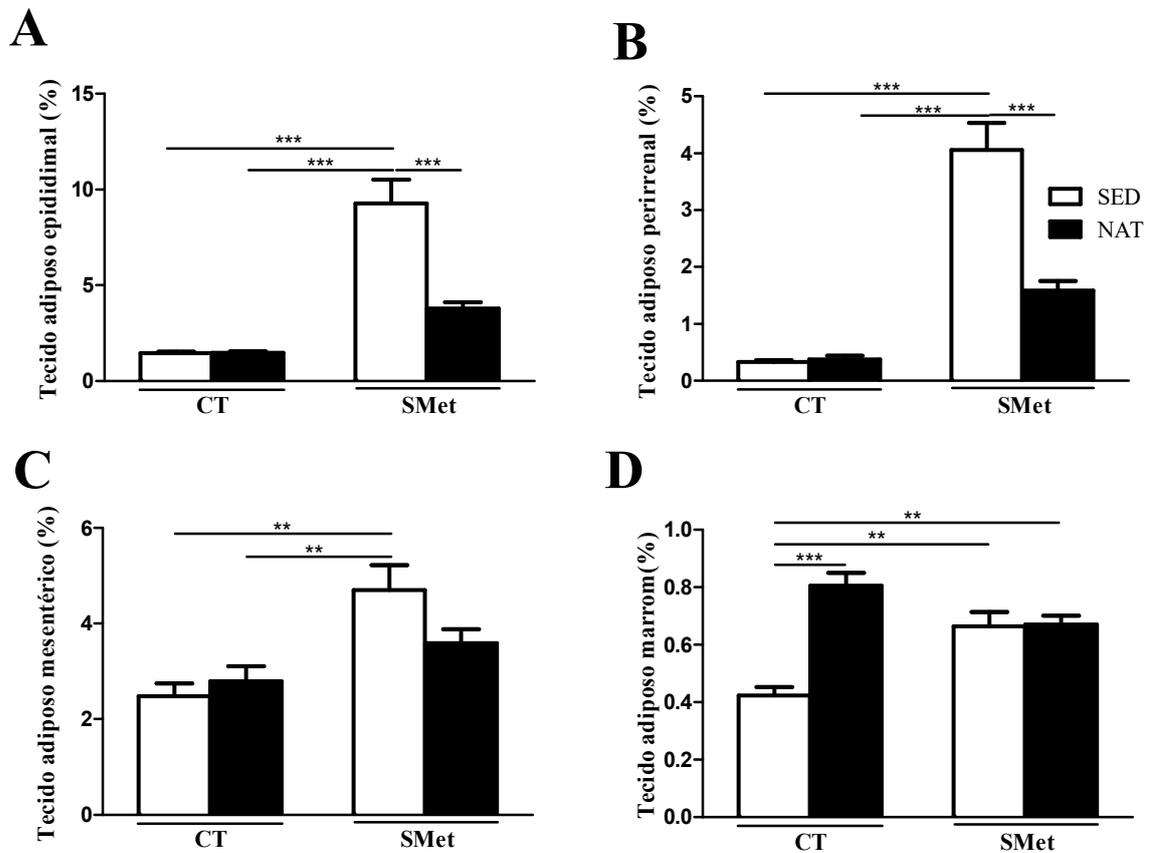
**A:** massa corporal mensurada semanalmente durante o período de experimentação; **B:** massa corporal final em estado alimentado; **C:** massa corporal final em jejum. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. Gráfico A: ANOVA duas vias - \* $p \leq 0,05$  comparando Smet/SED com CT/SED; # $p \leq 0,05$  comparando Smet/SED com Smet/NAT. Gráficos B e C: ANOVA uma via - \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Figura 11 - Índice de adiposidade branca e concentração plasmática de leptina de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.



**A:** índice de adiposidade; **B:** concentração plasmática de leptina; **C:** correlação entre índice de adiposidade e concentração plasmática de leptina. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Gráficos A e B: Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo; ANOVA uma via - \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ . Gráfico C: Dados de 4 camundongos C57Bl/6 por grupo; teste de correlação de Spearman.

Figura 12 - Massa de tecidos adiposos de camundongos C57Bl/6 submetidos à intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.



**A:** massa relativa de tecido adiposo epididimal; **B:** massa relativa de tecido adiposo perirrenal; **C:** massa relativa de tecido adiposo mesentérico; **D:** massa relativa de tecido adiposo marrom. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. ANOVA uma via - \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

**Tabela 1 - Perfil biométrico, bioquímico e tecidual de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação**

	CT/SED (n=5)	Ct/NAT (n=6)	SMet/SED (n=5)	SMet/NAT (n=6)
<i>Perfil Biométrico</i>				
Massa corporal final em estado alimentado (g)	29,32± 1,19	27,07±0,76	32,56±1,59	29,40±0,43
Massa corporal final em jejum (g)	27,80±1,08	24,78±0,64	32,18±1,55*	27,97±0,32#
Varição de massa corporal no período de indução de Smet (7 semanas)	4,52±0,33	4,23±0,57	10,28±0,99*	5,43±0,85#
Varição de massa corporal no período de natação (4 semanas)	0,48±0,46	-1,29±0,17 <sup>a</sup>	0,82±0,29	-1,07±0,75
Tíbia direita (mm)	18,60±0,24	18,17±0,17	18,60±0,24	18,00±0,00
Comprimento céfalo-anal (cm)	10,00±0,13	9,52±0,19	9,96±0,17	10,55±0,15
Circunferência abdominal (cm)	8,42±0,29	8,58±0,11	9,07±0,085	8,51±0,14
<i>Perfil bioquímico plasmático</i>				
Glicemia de jejum (mg.dL <sup>-1</sup> )	134,6±9,2	114,7±8,2	184,4±6,4*	117,3±5,4#
Glicemia em estado alimentado (mg.dL <sup>-1</sup> )	135,6±7,2	114,8±4,5	180,2±10,8*	147,8±5,4#
Cholesterol plasmático (mg.dL <sup>-1</sup> )	61,7±2,7	67,7±3,9	128,1±7,9*	82,6±7,9#
Triglicerídeos plasmático (mg.dL <sup>-1</sup> )	33,9±2,5	29,4±1,9	34,3±1,7	29,7±3,5
AGNE plasmático (mg.dL <sup>-1</sup> )	0,85±0,14	1,10±0,08	1,20±0,12	0,96±0,10
VLDL-C (mg.dL <sup>-1</sup> )	6.78±0.50	5.87±0.39	6.86±0.34	5.93±0.72
<i>Parâmetros teciduais</i>				
Índice de adiposidade(%)	2,85±0,16	3,03±0,17	10,16±0,89	5,58±0,34
Massa de tecido adiposo epididimal (%)	1,45±0,08	1,47±0,09	9,28±1,23*	3,79±0,33#
Massa de tecido adiposo perirrenal(%)	0,33±0,03	0,38±0,06	4,06±0,47*	1,59±0,16**
Massa de tecido adiposo mesentérico (%)	2,48±0,27#	2,80±0,31#	4,70±0,52	3,59±0,29
Massa de tecido adiposo marrom (%)	0,42±0,03	0,81±0,05*	0,66±0,05*	0,67±0,03*
Massa de músculo gastrocnêmio (%)	1,69±0,04	1,60±0,06	1,63±0,02	1,69±0,02
Massa hepática relativa(%)	6,71±0,32	6,29±0,32#	4,88±0,18*	5,87±0,18
Massa cardíaca relativa (%)	0,84±0,04#	0,85±0,04#	0,69±0,02*	0,84±0,03#
Massa relativa do intestino (%)	5,15±0,53#	5,12±0,21#	2,37±0,18*	2,65±0,18*
Massa relativa dos rins (%)	1,79±0,08	1,76±0,06	1,60±0,02	1,89±0,03#
Massa relativa dos pulmões (%)	0,88±0,01	0,93±0,04#	0,79±0,02	0,96±0,02#
Massa relativa do cérebro (%)	2,34±0,04	2,48±0,03	2,41±0,06	2,40±0,03
Massa relativa do baço (%)	0,45±0,03	0,31±0,03*	0,37±0,01	0,45±0,04

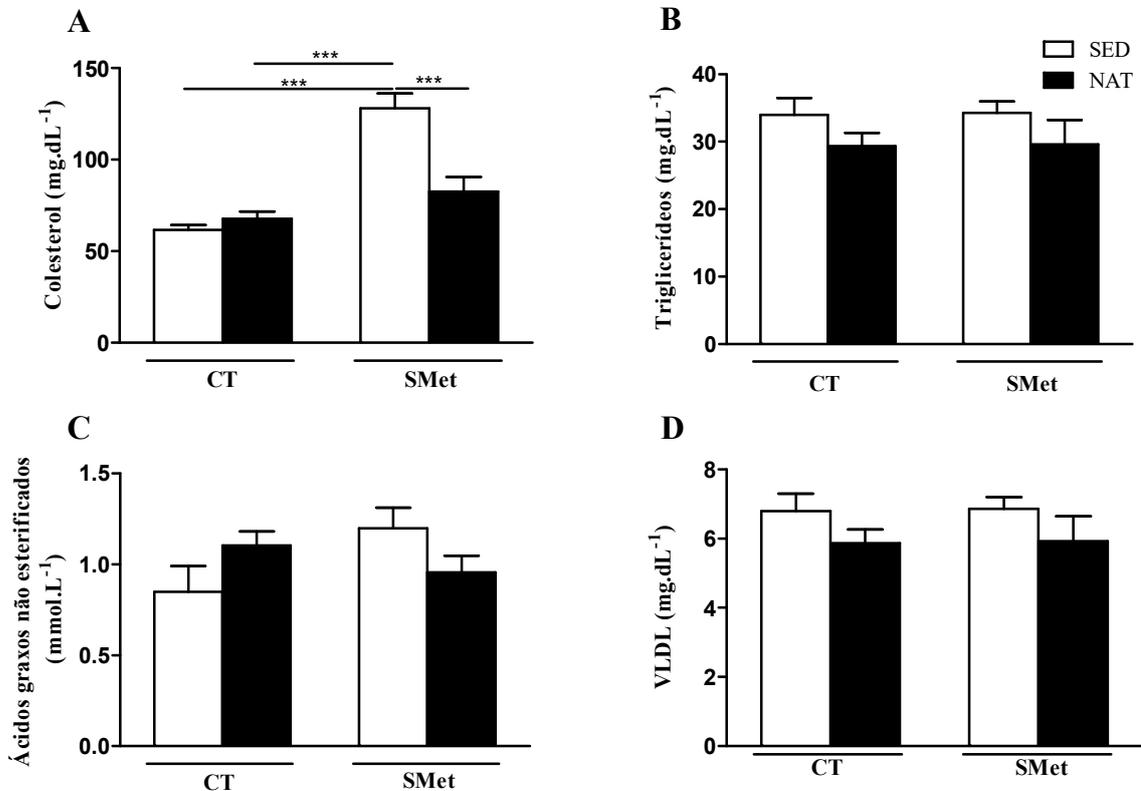
Dados expressos com média ± erro padrão da média de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo.

ANOVA uma via: \*p≤0,05 comparado ao grupo CT/SED; # p≤0,05 comparado ao grupo SMet/SED

#### 5.4 Perfil lipídico

A dosagem de lipídios plasmáticos revelou que camundongos que consomem dieta hiperlipídica têm maior concentração de colesterol no plasma, condição que não aconteceu quando os animais realizaram o protocolo de natação associado à intervenção dietética (**Figura 13A**). No presente estudo não houve diferença significativa nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos, e ácidos graxos não-esterificados e VLDL-C entre os grupos (**Figuras 13B, 13C e 13D**).

**Figura 13 - Perfil lipídico plasmático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



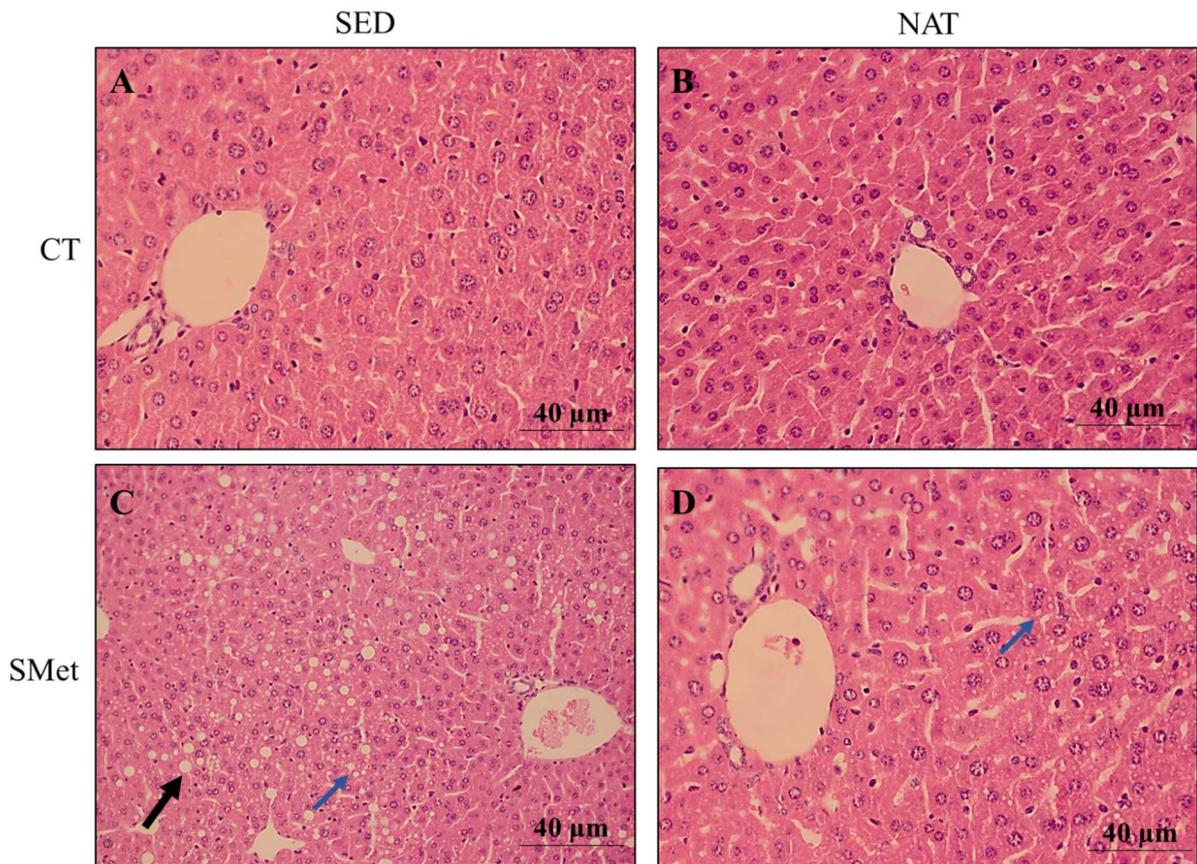
**A:** concentração plasmática de colesterol; **B:** concentração plasmática de triglicerídeos; **C:** concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados; **D:** estimativa da concentração plasmática de VLDL-C. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. ANOVA uma via \*\*\*P≤0,001.

Embora tenha-se identificado elevação apenas no colesterol plasmático no grupo SMet/SED, as imagens histológicas revelaram acúmulo de gordura no fígado desses animais (**Figura 14C**). Por outro lado, os animais do grupo SMet/NAT não apresentaram tal padrão de deposição lipídica no fígado, sugerindo um efeito protetor do exercício físico contra a esteatose hepática. Interessantemente, confirmou-se estes resultados das imagens histológicas pela quantificação de lipídios hepáticos totais pelo método de Folch<sup>127</sup>, onde observa-se que o fígado dos animais do grupo SMet/SED tem conteúdo de lipídios significativamente maior do que os demais grupos (**Figura 15A**). A análise dos lipídios extraídos das amostras de fígado demonstrou aumento tanto de triglicerídeos quanto de colesterol no grupo SMet/SED quando comparado aos demais grupo (**Figura 15B e 15C**). Afim de avaliar a excreção fecal lipídica, mensurou-se a presença de lipídios nas fezes. No entanto, não houve diferença significativa

entre o conteúdo de lipídios totais, colesterol e triglicerídeos nas fezes dos animais dos 4 grupos (**Figura 16**).

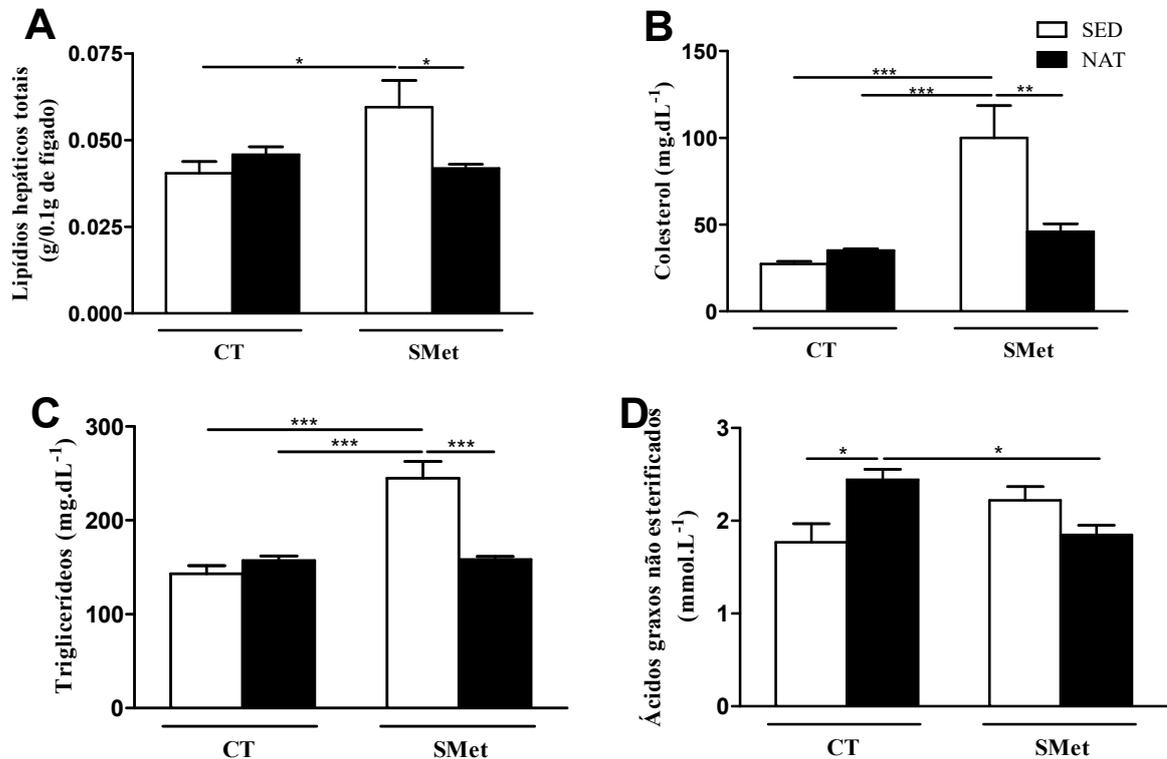
Interessantemente, observou-se aumento de ácidos graxos não-esterificados no fígado dos animais que consumiram dieta “chow” e nadaram quando comparados a seus controles sedentários (**Figura 12D**). Embora não tenha havido diferença estatística, um padrão semelhante foi observado nas concentrações plasmáticas de AGNE (**Figuras 10C**).

**Figura 14 - Cortes histológicos de fígado de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



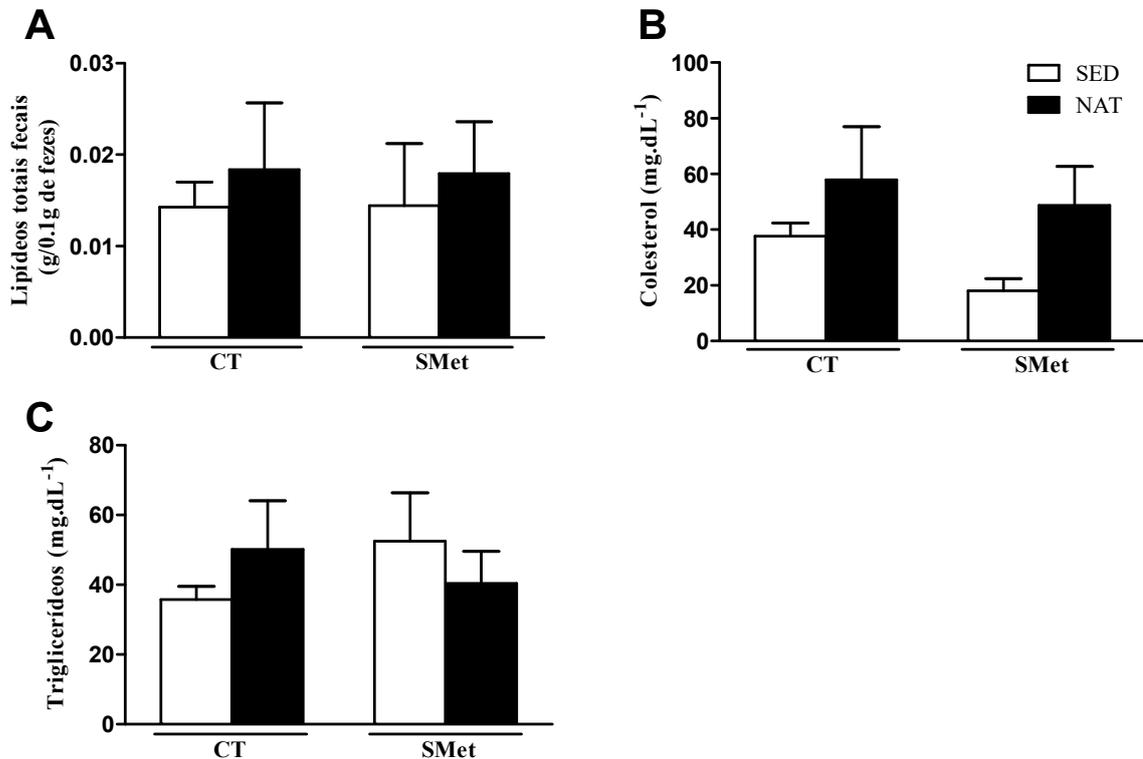
CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Imagens de cortes histológicos de fígado dos camundongos C57Bl/6 corados com hematoxilina e eosina por grupo. As setas azuis indicam os microvacúolos de lipídios e a seta preta macrovacúolo de lipídios.

**Figura 15 - Perfil lipídico hepático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



**A:** Conteúdo de lipídios por 0,1g de fígado; **B:** concentração hepática de colesterol; **C:** concentração hepática de triglicerídeos; **D:** concentração hepática de ácidos graxos não esterificados. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. ANOVA uma via - \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

**Figura 16 - Perfil lipídico nas fezes de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**

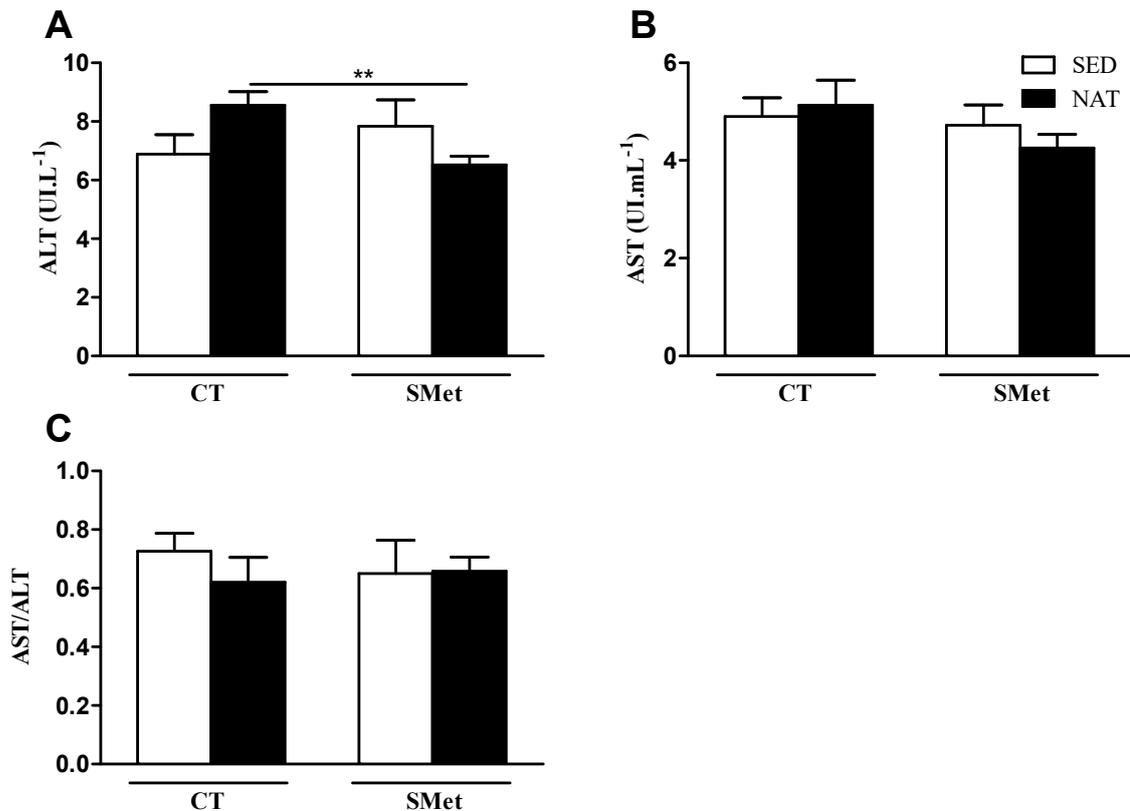


**A:** Conteúdo de lipídios por 0,1g de fezes; **B:** concentração fecal de colesterol; **C:** fecal hepática de triglicerídeos; **D:** concentração fecal de ácidos graxos não esterificados. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. ANOVA uma via.

### 5.5 Marcadores de dano hepático

Não se evidenciou efeito da dieta hiperlipídica ou do exercício físico sobre a concentração plasmática de ALT, AST ou razão ALT/AST na comparação entre os grupos intervenção e controle (**Figura 17**). No entanto, verificou-se redução da concentração de ALT no plasma dos camundongos do grupo SMet/NAT em comparação com o CT/NAT.

**Figura 17 - Concentração plasmática de enzima marcadoras de dano hepático em camundongos submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



Concentração plasmática - **A**: ALT; **B**: AST; **C**: razão ALT/AST. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. Teste t - \* $p \leq 0,05$ .

### 5.6 Expressão gênica de proteínas transportadoras de produtos do metabolismo lipídico no tecido hepático

No tecido hepático, analisou-se a expressão dos genes que codificam proteínas transportadoras de ácidos graxos através da membrana plasmática (CD36)<sup>135</sup> e no citoplasma (aP2).<sup>136</sup> Além destes, avaliou-se a expressão do gene que codifica a proteína CTP-1 $\alpha$ , a qual permite o transporte de acil-CoA do citoplasma do hepatócito para a matriz mitocondrial.<sup>113</sup>

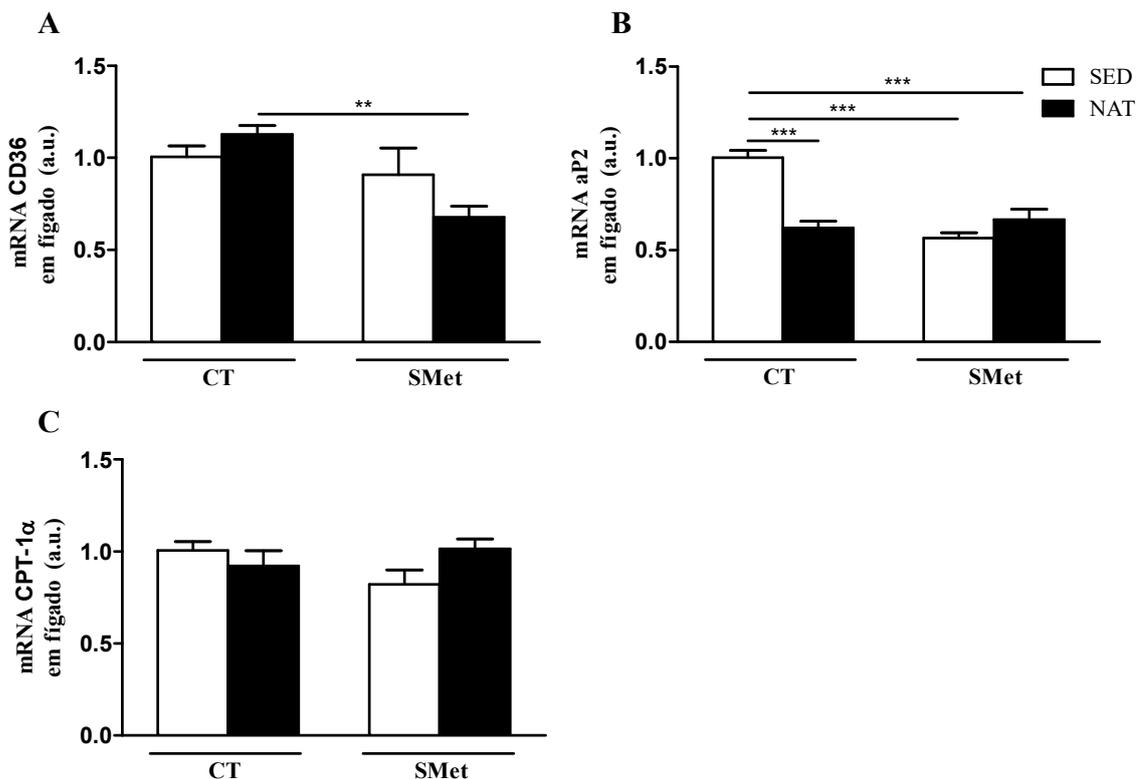
Conforme observa-se na **figura 18A**, o consumo de dieta hiperlipídica reduziu a expressão do gene CD36 em animais que realizaram o protocolo de exercício físico. Tal efeito da dieta não foi observado em animais sedentários, ambos os grupos (CT/SED e SMet/SED) apresentaram quantidade semelhante de mRNA para CD36 em tecido hepático.

Por outro lado, observou-se diminuição da expressão gênica de aP2 nos dois grupos de camundongos que consumiram dieta hiperlipídica e no grupo CT/NAT quando comparados

ao grupo CT/SED (**Figura 18 B**). Tais resultados sugerem que tanto a intervenção dietética quanto o exercício físico foram capazes de modular para menos a expressão do gene aP2.

Não foi observada diferença significativa da expressão gênica de CPT-1 $\alpha$  entre os grupos investigados.

**Figura 18 - Expressão gênica de proteínas transportadoras de produtos do metabolismo lipídico no tecido hepático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



Expressão gênica hepática - **A:** CD36; **B:** aP2; **C:** CPT-1 $\alpha$ . CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. ANOVA uma via - \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

### 5.7 Expressão de genes lipogênicos no tecido hepático

A partir da identificação de deposição de gordura no fígado de camundongos que consumiram HFD e do efeito protetor do protocolo natação frente a este agravo, procedeu-se a análise da expressão de genes que codificam enzimas-chave para a lipofase hepática: ACC-1, FAS e SCD-1.

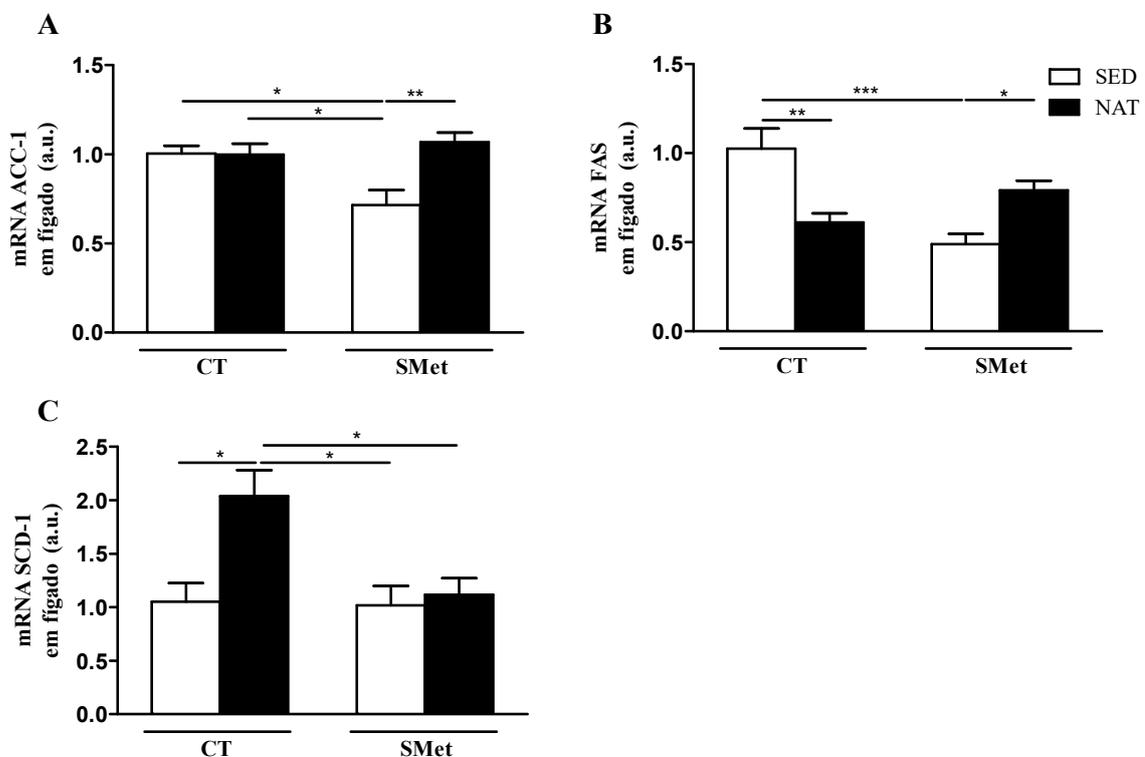
Observou-se que animais sedentários que consumiram dieta hiperlipídica apresentaram menor expressão gênica de ACC-1 quando comparados ao<sup>a</sup> demais grupos (**Figura 19A**). O

exercício físico manteve os níveis de mRNA de ACC-1 hepático dos camundongos SMet/NAT semelhante aos grupos controle (CT/SED e CT/NAT).

No que se refere ao faze que codifica a enzima FAS, verificou-se expressão maior no grupo CT/SED em comparação com seu controle treinado (CT/NAT) e com animais sedentários em intervenção dietética (SMet/SED) (**Figura 19B**). Por outro lado, os animais que consumiram HFD, concomitante ao protocolo de natação, apresentaram expressão gênica maior quando comparado a seus controles sedentários (SMet/SED). Diante destes resultados, não fica clara a existência de efeito da intervenção dietética ou do protocolo de natação sobre a expressão gênica da enzima FAS.

Verifica-se por meio da análise dos dados representados na **figura 19C** que o exercício físico promoveu aumento da expressão do gene SCD-1 no fígado apenas quando os animais consumiram dieta padrão. Os dados sugerem que o consumo de HFD inibe tal efeito, pois os animais do grupo SMet/NAT apresentaram valores de expressão gênica de SCD-1 no fígado semelhante aos animais dos grupos sedentários (CT/SED e SMet/SED).

**Figura 19 - Expressão de genes lipogênicos no tecido hepático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**

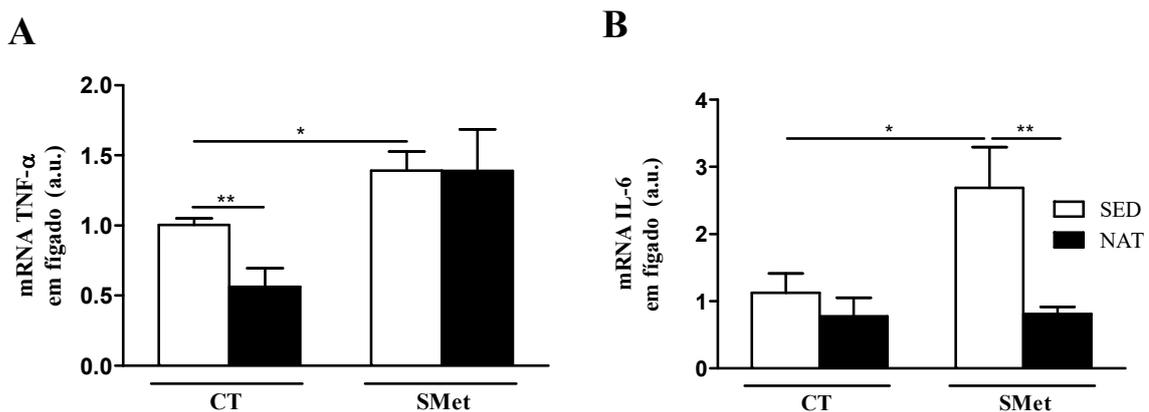


Dados referentes à expressão gênica hepática. **A:** ACC-1; **B:** FAS; **C:** SCD-1. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. ANOVA uma via - \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

### 5.8 Expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no tecido hepático

Conforme previamente explanado, a inflamação é um dos fatores que contribui para a progressão da DHGNA. A análise da expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-6 mostrou que a dieta HFD aumenta significativamente a expressão de ambos os genes em comparação com os grupos que co<sup>a</sup>sumiram dieta “chow” (**Figuras 20A e 20B**). O protocolo de natação reduziu a expressão gênica de TNF- $\alpha$  no grupo CT/NAT, no entanto não teve efeito no grupo SMet/NAT (**Figura 20A**). Por outro lado, a realização de exercício físico de baixa intensidade concomitante ao consumo de HFD foi capaz de reduzir a expressão do gene IL-6 no fígado dos animais SMet/NAT de modo a torna-la semelhante à expressão nos grupos que consumiram dieta “chow” (**Figura 20B**).

**Figura 20 - Expressão gênica de fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucina-6 no tecido hepático de camundongos C57Bl/6 submetidos à intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



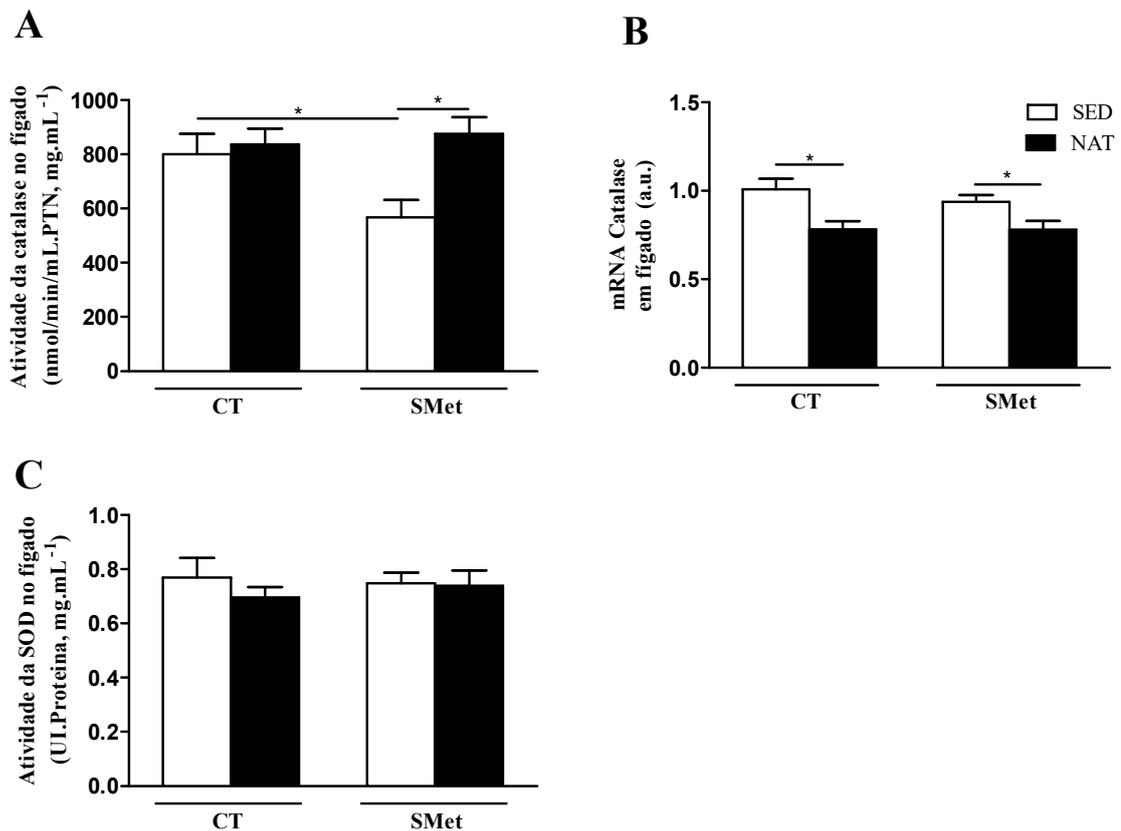
Dados referentes à expressão gênica hepática. **A:** TNF- $\alpha$ ; **B:** IL-6. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. Teste t - \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

### 5.9 Enzimas antioxidantes hepáticas

O consumo da dieta HFD reduziu a atividade da catalase no fígado de camundongos que se mantiveram sedentários (**Figura 21A**). Por outro lado, o protocolo de natação associado ao consumo da HFD impediu a redução da atividade enzimática, mantendo-a semelhante aos grupos que consumiram dieta “chow” (**Figura 21A**). O exercício físico promoveu redução na expressão gênica da catalase independente da dieta consumida, conforme dados expressos na **Figura 21B**.

Não foram identificadas diferenças na atividade da SOD decorrente da intervenção dietética ou da natação (**Figura 21 C**).

**Figura 21 - Atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase no tecido hepático de camundongos C57Bl/6 submetidos a intervenção dietética e tratados com protocolo de natação.**



**A:** atividade da catalase no fígado; **B:** expressão gênica hepática de catalase; **C:** atividade da SOD no fígado. CT- grupo que consumiu dieta “chow”; SMet – grupo que consumiu dieta “HFD”, SED – grupo sedentário, NAT – grupo submetido ao protocolo de natação. Dados de 5-6 camundongos C57Bl/6 por grupo. Gráfico A: Test t: \*  $p \leq 0,05$ . Gráfico ANOVA uma via - \* $p \leq 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO

Os dados obtidos na pesquisa experimental que compõe esta tese, mostram que o consumo por 11 semanas de uma dieta hiperlipídica com 58,4% de kcal provenientes de lipídios, desenvolvida no LRC, foi eficaz para a indução do fenótipo de esteatose hepática associada à SMet em camundongos C57Bl/6, endossando dados previamente publicados.<sup>123</sup> Por outro lado, a implementação de um protocolo de natação de baixa intensidade, simultaneamente ao consumo de HFD, reduziu disfunções metabólicas glicêmicas e lipídicas. Somando-se, observou-se significativa redução na deposição hepática de gordura associada à

menor expressão gênica da proteína transportadora CD36, bem como regularização dos níveis plasmáticos de leptina nos camundongos que nadaram. Além disso, o protocolo de exercício implementado foi capaz de reduzir a expressão gênica de IL-6 e aumentar a atividade da catalase. Dessa forma, sugere-se um potencial efeito da natação de baixa intensidade em evitar a progressão da DHGNA por meio de redução da inflamação hepática e aumento da atividade antioxidante no fígado de camundongos C57bl/6.

O primeiro componente da SMet investigado nos animais que consumiram HFD foi a disfunção no metabolismo glicêmico. O consumo excessivo de lipídios levou os camundongos a um quadro de intolerância à glicose e menor sensibilidade à insulina, condições não apresentadas pelos animais que realizaram o protocolo de natação concomitante ao consumo de HFD. Estudos previamente publicados endossam o efeito de dietas hiperlipídicas como causadoras de intolerância à glicose, bem como o potencial de protocolos de exercício físico de diferentes modalidades em reverter tais disfunções.<sup>75, 76, 80, 81, 82, 84, 85, 93, 96, 97, 98, 102, 103</sup> Em nosso estudo, a hiperglicemia, característica da intolerância à glicose, foi reduzida pela natação tanto no estado alimentado quanto em jejum. Tal achado é corroborado por outros cinco estudos que demonstraram que a natação é capaz de prevenir e/ou reverter a elevação dos níveis de glicose no sangue de camundongos que consomem dietas ricas em lipídios.<sup>75, 101, 102, 103, 137</sup> Observou-se o efeito da natação na regularização do metabolismo glicêmico tanto em protocolos longos de 8<sup>101</sup>, 10<sup>102</sup>, 12<sup>103</sup> e 13<sup>137</sup> semanas, quanto a curto prazo como observado tanto no presente estudo como em outro realizado por Suga e colaboradores<sup>75</sup>. Estes autores também empregaram um protocolo de 4 semanas, porém com tempo de sessão de apenas 90 minutos por dia.

Os índices glicêmicos mais elevados no grupo SMet/SED parecem estar associados à menor sensibilidade à insulina neste grupo, verificada pelo maior tempo para decaimento da glicemia observado durante o teste de resistência à insulina e por maior HOMA-IR. Além disso, embora não se tenha verificado diferença estatística, há um aumento numérico do HOMA- $\beta$  nos animais do grupo SMet/NAT, sugerindo um incremento na função das células  $\beta$ -pancreáticas. Tal achado pode ter um significado fisiológico visto que os camundongos que nadaram concomitante ao consumo de HFD tiveram maior tolerância à glicose e sensibilidade à insulina quando comparados aos seus controles sedentários. Este efeito pode estar relacionado à uma compensação pancreática para manutenção dos níveis regulares de glicose no sangue.

Considerando-se os resultados em conjunto, sugere-se que os animais que consomem a dieta HFD e mantem-se sedentários tendem a menor sensibilidade à insulina decorrente de

diminuição na função de células  $\beta$ -pancreáticas, o que não ocorre nos animais que consomem a dieta hiperlipídica e realizam o protocolo de natação. Isso pode explicar a menor tolerância à glicose no grupo SMet/SED. É possível que a progressão para resistência à insulina associada à dieta e ao sedentarismo, não constatada no presente estudo, seja tempo-dependente; o que poderá ser investigado por meio de protocolos de intervenção mais prolongados.

Com relação ao metabolismo lipídico, a potencialidade de dietas hiperlipídicas em causar hipercolesterolemia em camundongos é amplamente relatada na literatura.<sup>75, 81, 86, 91, 95, 96, 97, 98, 102, 103</sup> Em tais estudos o conteúdo lipídico das dietas variou entre 33,4% e 60% das Kcal. Camundongos que consumiram HFD e realizaram exercício físico apresentaram níveis de colesterol plasmático menores quando comparados a seus controles sedentários em estudos com corrida em esteira motorizada<sup>81, 96, 97, 98</sup>, natação<sup>86, 102, 103</sup> e vibração de corpo inteiro.<sup>91</sup> Tais dados sugerem que protocolos utilizando exercício físico de diversas modalidades são eficazes em reverter a hipercolesterolemia.

Embora no presente estudo não tenha havido diferença significativa nos níveis de triglicerídeos e AGNE plasmáticos entre os grupos estudados, trabalhos anteriormente publicados mostram que o consumo de HFD pode elevar os níveis plasmáticos de triglicerídeos<sup>75, 81, 91, 95, 96, 97, 98, 102, 103</sup> e AGNE.<sup>75, 81, 96</sup> Nesses estudos, os protocolos de exercício em esteira motorizada foram mais eficazes na reversão das dislipidemias.<sup>81, 95, 96, 97, 98</sup>

Os resultados obtidos na investigação do perfil lipídico hepático sugerem que o excesso de lipídios consumidos na dieta não elevou os níveis de triglicerídeos plasmáticos, pois estes foram direcionados para armazenamento no tecido hepático, bem como no tecido adiposo. Possivelmente, esse mecanismo não ocorre nos camundongos que nadam, pois, o excesso de calorias consumidas é utilizado como fonte de energia para o exercício. Esses achados corroboram com estudos previamente publicados em que animais que consumiram HFD apresentaram esteatose hepática, fibrose e infiltração de macrófagos no fígado.<sup>68, 91, 95, 102, 103</sup> Nestes trabalhos o exercício físico reduziu todas as alterações na estrutura do fígado, mesmo na manutenção de intervenção dietética hiperlipídica.<sup>68, 91, 95, 102, 103</sup>

No presente estudo, a identificação de deposição de lipídios no tecido hepático dos camundongos alimentados com HFD pelo período total de 11 semanas sugere que a dieta utilizada pode levar ao quadro de esteatose hepática. Tal período de intervenção não foi suficiente para o desenvolvimento de lesão tecidual, conforme observado pela manutenção de níveis regulares das enzimas ALT, AST e razão AST/ALT em todos os grupos. A elevação de

tais marcadores no plasma está relacionada à maior severidade do comprometimento da estrutura hepática como a fibrose e cirrose.<sup>130</sup> Dessa forma, infere-se que os camundongos do presente estudo apresentaram a DHGNA em seu primeiro estágio.

A progressão da esteatose hepática para os demais estágios da DHGNA está relacionada a aumento da inflamação e estresse oxidativo.<sup>7</sup> Este último pode ser definido como um excesso de EROs devido ao aumento na sua produção ou deficiência no sistema de defesa antioxidante.<sup>138</sup> Neste contexto, as enzimas antioxidantes intracelulares de maior relevância são a SOD, a glutathione peroxidase e a catalase. Em um estudo com camundongos “knock-out” para a catalase, demonstrou-se que esta enzima exerce um efeito protetor contra a esteatose e inflamação hepáticas por meio da manutenção do equilíbrio redox no fígado.<sup>139</sup> No presente estudo constatou-se que a HFD reduziu a atividade da catalase no fígado. Interessantemente, o protocolo de natação restaurou a atividade enzimática antioxidante para níveis semelhantes aos dos camundongos que consumiram dieta “chow”. Além disso, a natação reduziu a expressão gênica da catalase, independentemente do tipo de dieta consumida. Conforme observado nas **Figuras 21A** e **21B**, não há relação de proporcionalidade entre a expressão gênica e a atividade da catalase, resultado também identificado em ratos Wistar-Kyoto.<sup>140</sup> Assim, é possível que haja um “feedback” negativo entre a atividade da enzima e sua expressão gênica. Em nosso estudo não foi identificada diferença na atividade da SOD entre os grupos. Zacarias e colaboradores<sup>141</sup> identificaram aumento na atividade desta enzima no fígado de ratos Wistar devido ao consumo de dieta hiperlipídica. No entanto, semelhante aos nossos achados, não houve efeito do exercício físico sobre a atividade desta enzima.<sup>141</sup>

A análise da expressão de genes pró-inflamatórios no presente estudo revelou que o consumo de HFD aumenta a expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-6. No entanto, a execução do protocolo de natação reverteu esse efeito apenas na expressão do gene IL-6. Diferente dos nossos achados, estudo que utilizaram protocolos de exercício por tempo prolongado em esteira motorizada (16 semanas)<sup>68</sup> ou natação (13 semanas)<sup>137</sup> verificaram redução da expressão do gene TNF- $\alpha$  no fígado.

Considerando em conjunto os resultados obtidos, observa-se que o protocolo de exercício de baixa intensidade aumentou a defesa antioxidante hepática e reduziu a expressão gênica de IL-6, configurando-se como uma ferramenta protetora para a progressão da DHGNA.

O consumo crônico de dieta hiperlipídica (por 23 semanas) foi associado ao aumento da expressão gênica hepática de CD36 e aP2; além de diminuição da expressão do gene CPT-

1 $\alpha$  em um modelo dietético de DHGNA.<sup>142</sup> CD36 é uma glicoproteína de membrana que tem um papel importante na captação de ácidos graxos por diversos tecidos, tais como músculo, tecido adiposo branco e fígado.<sup>135</sup> O aumento da expressão desta proteína no fígado está associado a maior captação e estoque de ácidos graxos no tecido hepático, pois permite um mecanismo adicional de transporte transmembrana facilitado por proteína.<sup>143</sup> No entanto, em nosso estudo, não se observou aumento da expressão do gene CD36 associado ao consumo de HFD. Por outro lado, camundongos com SMet que realizaram o protocolo de natação apresentaram menor expressão gênica de CD36 quando comparado ao grupo CT/NAT, sugerindo um possível papel do exercício físico em reduzir o acúmulo de lipídios no fígado via CD36. Tal resultado, corrobora os achados de Wu e colaboradores,<sup>103</sup> que observaram redução da expressão gênica de CD36 no fígado após protocolo de natação de 12 semanas. Sugere-se, dessa forma, que a modulação da expressão gênica de CD36 pode ocorrer tanto em camundongos submetidos a protocolos de natação de longa duração (12 semanas)<sup>103</sup> quanto em a protocolo de menor duração e baixa intensidade, como aquele empregado no presente estudo.

Além das proteínas que facilitam o transporte através da membrana plasmática do hepatócito, identificou-se no meio citoplasmático proteínas ligadoras de ácidos graxos FABP.<sup>144</sup> Identificou-se a princípio que o gene aP2 codifica a expressão proteica de FABP em adipócitos.<sup>145</sup> No entanto, em estudo mais recente Pan e colaboradores<sup>146</sup> demonstraram que o consumo crônico de HFD aumenta a expressão gênica de aP2 no fígado de camundongos C57Bl/6. As funções fisiológicas e fisiopatológicas das FABPs não são completamente esclarecidas, no entanto tem-se associado a sua expressão no fígado<sup>147</sup> ou concentração sistêmica<sup>148</sup> à DHGNA. Em nosso estudo, as duas intervenções realizadas, dieta hiperlipídica e exercício físico, reduziram a expressão gênica de aP2. Apesar de os animais que apresentaram depósito hepático de lipídios (SMet/SED) terem mantido níveis baixos de expressão do gene aP2, é preciso considerar o tempo de exposição à dieta. No estudo de Pan e colaboradores<sup>146</sup> apenas após 16 semanas de consumo de dieta hiperlipídica foi verificado aumento da expressão do gene aP2. Por outro lado, em estudo do nosso grupo (dados não publicados) a intervenção com HFD por 20 semanas também levou a aumento na expressão gênica de aP2. Considerando-se que em nosso trabalho a intervenção dietética teve duração de 11 semanas, é possível que o efeito da dieta sobre a expressão de aP2 seja tempo-dependente. Os resultados sugerem que o exercício físico é capaz de reduzir a expressão deste gene que está associado ao desenvolvimento de DHGNA.

No tocante ao efeito do consumo de dieta hiperlipídica sobre a expressão gênica de CPT-1 $\alpha$  em tecido hepático, os achados são divergentes. Em nosso estudo não se observou diferença estatística dentre os grupos analisados. Contudo, Cong e colaboradores<sup>142</sup> encontraram diminuição da expressão gênica de CPT-1 $\alpha$  após 23 semanas de intervenção dietética. Em outro estudo com duração de 12 semanas, o consumo de HFD levou a aumento na expressão gênica hepática de CPT-1 $\alpha$ , o que foi ainda mais incrementado no fígado de animais que realizaram um protocolo de natação de 12 semanas.<sup>86</sup> No que se refere à expressão proteica, identificou-se redução de CPT-1 $\alpha$  devido ao consumo de dieta hiperlipídica, o que foi revertido pela realização de treinamento em esteira motorizada.<sup>26</sup>

Em conjunto, os dados de expressão gênica de transportadores de lipídios sugere que o exercício físico tem efeitos a curto prazo sobre a modulação desses genes, enquanto a dieta hiperlipídica parece modulá-los apenas mediante consumo crônico.

Além de aumento na captação de lipídios, a produção de gordura (lipogênese) no tecido hepático pode contribuir para o desenvolvimento de DHGNA.<sup>111</sup> As enzimas ACC-1 e FAS participam da via lipogênica catalisando a conversão de acetil-CoA em malonil-CoA e deste em palmitato, respectivamente.<sup>113</sup> A partir desse ponto, o palmitato pode ser dessaturado e alongado para oxidação na mitocôndria<sup>113</sup> ou servir de substrato para a enzima SCD-1 para a biossíntese de ácido graxos monoinsaturados que serão armazenados no fígado.<sup>114</sup> No presente estudo, observou-se que o consumo de HFD reduziu a expressão dos genes hepáticos ACC-1 e FAS, o que não ocorreu nos animais que participaram do protocolo de natação. Nesta perspectiva, destaca-se que fatores de transcrição inseridos no retículo endoplasmático (SREBPs) são ativados na ausência de esterois nos hepatócitos, ligam-se ao SER e ativam os genes lipogênicos FAS, ACC e SCD-1.<sup>113</sup> Dessa forma, hipotetiza-se que a supressão da expressão de tais genes no fígado dos animais do grupo SMet/SED deu-se devido ao excesso de esterois advindo do consumo de HFD, o que impede a ativação dos SREBPs e, conseqüentemente a ativação dos genes lipogênicos. O mesmo não ocorre nos camundongos SMet/NAT, pois o excesso de lipídios consumidos é oxidado para atender a demanda energética do exercício físico. Os achados de redução da expressão gênica de FAS e ACC-1 associada a HFD são corroborados por um estudo com camundongos swiss<sup>107</sup> Os autores observaram aumento da expressão dos genes ACC-1 e FAS no fígado em resposta ao exercício de moderada e alta intensidade.<sup>107</sup>

Contrapondo o conceito clássico de que a inibição da ACC conduz a redução da lipogênese, Chow e colaboradores<sup>149</sup> identificaram através da utilização de um duplo “knock out” para ACC-1 e ACC-2 que na ausência dessas enzimas há redução da oxidação de lipídios

nas mitocôndrias, o que resulta em acúmulo de gordura nos hepatócitos. Este achado pode fundamentar nosso resultado de que a HFD reduz a expressão gênica de ACC-1 no grupo SMet/SED levando ao quadro de esteatose hepática. O protocolo de natação reverte tal alteração por meio da normalização da expressão do gene ACC-1.

O achado de aumento na expressão hepática do gene que a codifica SCD-1 apenas nos animais do grupo CT/NAT pode ser explicado pelo fato de que os animais desse grupo têm um aporte energético menor, comparando-se com aqueles que consomem HFD. Diante disso, a ausência de esteróis no fígado estimula a expressão do gene SCD-1. No entanto, estudos previamente publicados mostram que o consumo de dietas hipercalóricas pode aumentar expressão gênica<sup>103</sup> e proteica<sup>94</sup> de FAS e SCD-1.

Interessantemente, o aumento de ácidos graxos não-esterificados no fígado dos animais que consumiram dieta “chow” e nadaram, reforça a hipótese de que esses animais precisam utilizar os lipídios hepáticos como fonte energética. AGNE são a forma lipídica liberada na lipólise em quilomicrons, lipoproteínas, fígado e tecido adiposo por ação das proteínas lipases.<sup>150</sup> Ou seja, os AGNE são os lipídios biodisponíveis para a utilização como substrato energético. Nossos resultados levam-nos a inferir que os camundongos que consomem dieta padrão e realizam exercício físico (grupo CT/NAT) tem maior atividade lipolítica para fornecer AGNE que serão utilizados como substrato energético, o que justificaria a elevação desses lipídios no plasma e fígado desses animais. Em um estudo com camundongos C57Bl/6 saudáveis, demonstrou-se que em longo prazo há aumento de AGNE e glicerol no plasma dos animais que realizavam exercício voluntário, sugerindo aumento na oxidação de lipídios.<sup>151</sup> Por outro lado, em nosso estudo, esse mecanismo parece estar prejudicado nos animais que realizam exercício, mas consomem HFD.

Os estudos consultados discordam no que se refere ao impacto do exercício físico sobre a massa corporal total de camundongos em consumo de HFD. Considerando o emprego de protocolos de natação, alguns autores relatam redução da massa corporal dos animais que consumiram HFD e realizam exercício.<sup>75, 86, 87; 88, 93, 102, 103</sup> Por outro lado, outros estudos não identificaram efeito do exercício sobre a massa corporal quando os animais foram alimentados com dietas hiperlipídicas.<sup>100, 101</sup> A potencialidade do exercício de natação em reduzir o tecido adiposo branco observada em nosso estudo é ratificada por outros 3 trabalhos.<sup>75, 102, 103</sup>

Neste estudo os animais que ingeriram dieta hipercalórica e não realizam atividade física apresentaram aumento da massa corporal total devido, principalmente, a elevação na deposição de gordura nos sítios do tecido adiposo branco. Por outro lado, a redução na massa

de tecido adiposo branco observada nos camundongos que executaram o protocolo de natação pode estar associada a um aumento na lipólise para fornecer ácidos graxos como substrato energético para oxidação. Estudos com outras espécies de roedores mostraram que o exercício físico aumentou a concentração de lipases (ATGL e HSL), perilipina e COX no tecido adiposo de ratos Wistar.<sup>105</sup> A perilipina é uma proteína do adipócito que ativa a HSL.<sup>117</sup> Esta, juntamente com a ATGL, atua no citoplasma clivando triglicerídeos para liberar ácidos graxos e uma molécula de glicerol.<sup>117</sup> Estes processos lipolíticos fornecem ácidos graxos a serem metabolizados através da  $\beta$ -oxidação e da cadeia de transporte de elétrons (ETC) para produzir energia.<sup>117</sup> No último passo da ETC, a COX é uma enzima fundamental para remover os elétrons.<sup>105</sup> Em um estudo com hamsters, os autores propuseram que a lipólise associada ao exercício é devida a ação dos glicocorticóides, através do aumento na quantidade de receptores de glucocorticóide e 11- $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11 $\beta$ HSD1).<sup>118</sup>

Conforme identificado, a massa de tecido adiposo branco tem forte correlação com a concentração plasmática de leptina. Esta é produzida nos adipócitos e age em sítios do sistema nervoso central, especialmente no hipotálamo, onde regula o gasto energético e o consumo alimentar por meio da inibição de vias orexígenas e ativação de vias anorexígenas.<sup>47</sup> Em nosso estudo, observou-se que a concentração de leptina no plasma dos animais do grupo SMet/SED foi estatisticamente maior quando comparados aos demais grupos. Tal condição é comum em animais obesos, devido a aumento na produção de leptina e resistência a sua ação em receptores hipotalâmicos.<sup>152</sup> No entanto, não foi possível a realização de testes funcionais para verificar se os animais que apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de leptina tinham resistência à sua ação.

Além do clássico papel da leptina na regulação do metabolismo energético por ação no hipotálamo, sugere-se uma forte associação entre a hiperleptinemia e a progressão da DHGNA.<sup>153, 154</sup> Miyamoto e colaboradores<sup>155</sup> propuseram que a leptina atua no sistema nervoso central ativando nervos simpáticos indutores da atividade de AMPK hepática via estimulação  $\alpha$ -adrenérgica, evento redutor da esteatose hepática. Em contrapartida, a resistência leptínica é um dos principais determinantes da deposição de triglicerídeos no fígado.<sup>156</sup>

A partir da identificação de receptores de leptina em tecidos periféricos, dentre eles o fígado, propõe-se a ação deste hormônio diretamente no tecido hepático.<sup>157, 158</sup> Ademais, sugere-se que a leptina promove fibrogênese no fígado através de aumento do TGF- $\beta$ .<sup>159</sup> Além disso, esta adipocina aumenta a resposta proliferativa de células estreladas hepáticas através do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).<sup>159</sup> Atribui-se tal efeito à vias

de sinalização intracelular que envolvem proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e PI3K/Akt.<sup>159</sup> Dessa forma, a hiperleptinemia observada nos camundongos do grupo SMet/SED (**Figura 11B**) pode ser um componente desencadeador da progressão da DHGNA, principalmente, aumentando áreas fibróticas hepáticas.

O aumento da expressão de genes pró-inflamatórios e fibrose, associados a redução da atividade antioxidante, indicam que a HFD contribui para o desenvolvimento de DHGNA. Com base nos achados anteriormente elencados, postula-se que a capacidade do protocolo de natação de reverter tais alterações revela que o exercício físico de baixa intensidade, embora não seja recomendado para melhorar o condicionamento físico,<sup>34</sup> pode auxiliar na proteção contra a DHGNA associada à SMet.

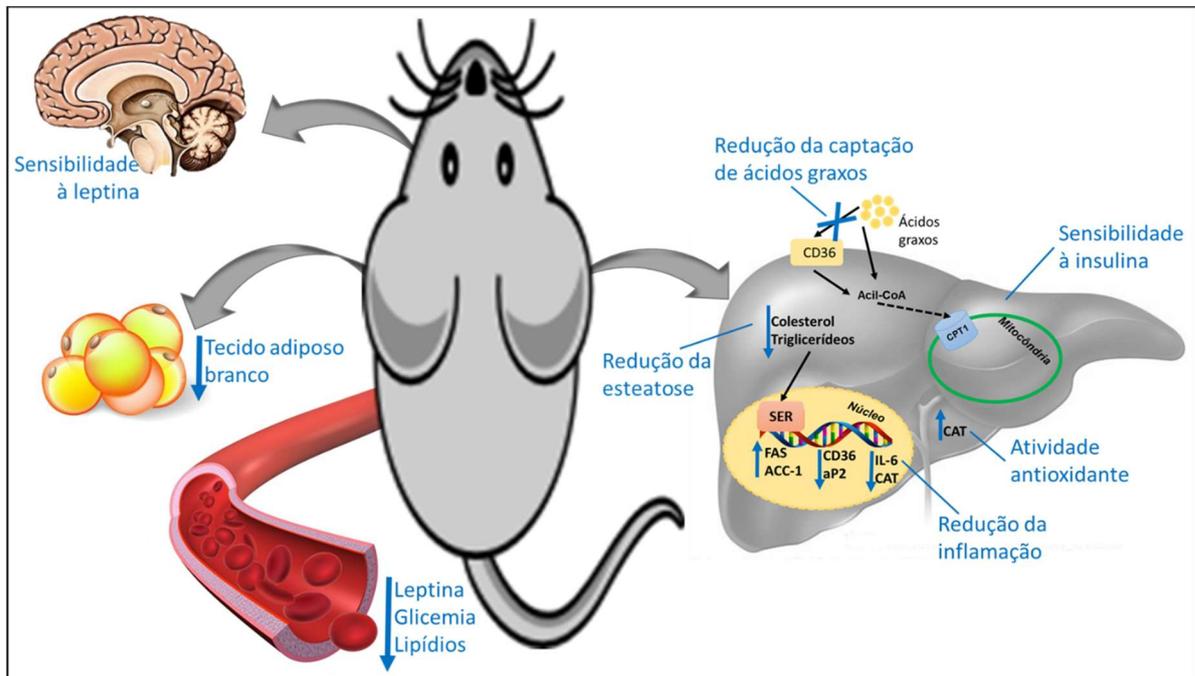
Observou-se que os animais que realizaram o protocolo de natação e consumiram dieta “chow” tinham maior massa de TAM quando comparados a seus controles sedentários, no entanto o consumo de HFD impediu o aumento de TAM associado ao exercício físico (**Figura 12D**). Madden e colaboradores<sup>160</sup> demonstraram que, em um modelo de exposição crônica ao frio, a dieta hiperlipídica impede a ativação do TAM por meio de um mecanismo aferente vagal. Estes achados são interessantes, pois sugerem que o consumo de HFD está relacionada a menor gasto energético. O TAM é um tecido energeticamente ativo caracterizado pela alta densidade de mitocôndrias e expressão de proteína desacopladora-1 (UCP-1), com alta capacidade oxidativa, conferindo capacidade termogênica sem a necessidade de energia mecânica.<sup>161, 162</sup> Além disso, a ativação do TAM é regulada pelo sistema nervoso central por meio da ligação de norepinefrina a receptores  $\beta$ -adrenérgicos.<sup>162</sup> A estimulação adrenérgica do TAM aumenta a lipólise e a liberação de ácidos graxos para a  $\beta$ -oxidação mitocondrial.<sup>162</sup> A intensidade do exercício parece ser determinante sobre o remodelamento do TAM em animais que consomem HFD. Wang e colaboradores<sup>107</sup> demonstraram que o exercício intervalado de alta intensidade aumenta a atividade do TAM mesmo em camundongos que mantiveram o consumo de HFD, no entanto este efeito não foi obtido com o emprego de exercício de intensidade moderada.

Embora não esteja clara a via pela qual o exercício físico estimula o crescimento do TAM,<sup>163</sup> alguns estudos sugerem que a leptina pode contribuir para o aumento de tal tecido.<sup>164</sup> A leptina ativa a termogênese pelo aumento da estimulação simpática de receptores  $\beta$ -adrenérgicos no TAM.<sup>165</sup> Este mecanismo ativa a UCP-1 para produzir calor.<sup>166</sup> A partir dos nossos resultados à luz dos estudos previamente publicados sugere-se que nos camundongos que nadam e consomem dieta “chow” há um incremento no gasto energético por ambos estímulos, leptina e exercício físico, que ativam a termogênese no TAM, além da energia

dispendida na contração muscular para a manutenção do exercício físico. Por outro lado, nos camundongos do grupo SMet/NAT o gasto energético adicional devido a aumento ativação do TAM é comprometido pelo consumo de HFD.

Os resultados desta tese sugerem que o modelo experimental de natação tem efeito protetor contra dislipidemias e intolerância à glicose decorrentes do consumo de dieta hiperlipídica por meio da redução do tecido adiposo branco e manutenção de níveis regulares de leptina. Esta estimula a sinalização da insulina para a captação de glicose pelas células e regulação do metabolismo glicídico no fígado.<sup>47</sup> Verificou-se redução de lipídios totais, triglicerídeos e colesterol no tecido hepático, o que repercutiu no aumento da expressão de genes lipogênicos e redução da expressão de genes relacionados ao transporte de lipídios para o fígado. Somou-se a isso a redução da expressão gênica da citocina pró-inflamatória IL-6 e aumento da atividade da catalase, uma enzima antioxidante. Além disso, a redução da hiperleptinemia reduz a fibrogênese hepática.<sup>159</sup> (**Figura 22**).

**Figura 22 - Modificações metabólicas decorrentes do protocolo de exercício físico de baixa intensidade na modalidade natação em camundongos C57Bl/6 com DHGNA associada à SMet.**



A implementação do protocolo de natação simultaneamente ao consumo de dieta hiperlipídica reduziu a glicemia, intolerância à glicose, concentração de lipídios no plasma. Verificou-se regularização dos níveis plasmáticos de leptina devido à redução de tecido adiposo branco e provável melhora na sensibilidade dos receptores hipotalâmicos. Somando-se, observou-se significativa redução na deposição hepática de gordura associada à menor expressão gênica de CD36, aP2. Houve aumento da expressão de genes lipogênicos acetil-CoA carboxilase (ACC-1) e ácido graxo sintase (FAS) por ativação do elemento de regulação do esteroide (SER) devido à redução de esteróides (triglicérides e colesterol) no hepatócito. Além disso, o protocolo de exercício implementado foi capaz de reduzir a expressão gênica de interleucina-6 (pró-inflamatória) e aumentar a atividade da catalase (antioxidante).

## 7. CONCLUSÃO

O modelo de natação, caracterizado como exercício físico de baixa intensidade, mostrou-se eficiente para a proteção contra DHGNA associada à SMet. Tal achado está relacionado à redução de deposição de gordura hepática, menor expressão de CD-36 e regularização dos níveis plasmáticos de leptina. Além disso, a natação foi capaz de modular genes lipogênicos por mecanismo relacionado ao conteúdo de lipídios hepáticos e à sinalização de fatores de transcrição (SREBP). O aumento da atividade antioxidante e redução da expressão de IL-6 sugerem que o protocolo de natação pode ser protetor contra a evolução da DHGNA. As modificações na morfologia e função hepáticas ocorrem concomitante à melhora no perfil lipídico e glicêmico sistêmico decorrentes da execução do protocolo de

natação. Diante do exposto, o exercício físico de baixa intensidade apresenta-se como uma ferramenta promissora para o manejo da DHGNA associada à SMet.

## 8. LIMITAÇÕES

No presente estudo a carga de exercício físico não foi individualizada. Dessa forma, é possível que o protocolo de natação utilizado tenha diferentes intensidades para os camundongos. Dessa forma, faz-se necessário o estabelecimento da curva de esforço máximo para natação em camundongos e estabelecimento de cargas individualizadas para estudos futuros.

## 9. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, intenta-se aprofundar a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na proteção e/ou reversão da SMet mediante a realização de exercício físico. Nesta direção, pretende-se avaliar a expressão proteica dos transportadores de lipídios e enzimas lipogênicas em tecido hepático, bem como investigar mais detalhadamente as alterações morfológicas do fígado decorrentes do consumo de HFD e da intervenção com exercício físico de baixa intensidade. Além disso, faz-se necessário a ampliação da avaliação de marcadores do equilíbrio redox para a caracterização de biomarcadores desta via em camundongos. Nessa perspectiva, pretende-se avaliar a peroxidação lipídica e a atividade da glutatona peroxidase.

## REFERÊNCIAS

1. SCHAFFNER, F.; THALER, H. Nonalcoholic fatty liver disease. **Progress in liver disease**, v. 8, p. 283-98, 1986.
2. ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **N Engl J Med**, v. 346, n. 16, p. 1221-31, Apr 18 2002.
3. COTRIM, H. P. **Esteatose hepática**. 2018. Disponível em: < <http://sbhepatologia.org.br/imprensa/esteatose-hepatica/> >. Acesso em: 29 de novembro 2018.
4. WHO. **Obesity and overweight**. 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> >. Acesso em: 29 de novembro 2018.

5. MOORE, J. X.; CHAUDHARY, N.; AKINYEMIJU, T. Metabolic Syndrome Prevalence by Race / Ethnicity and Sex in the United States , National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-2012. **Prev Chronic Dis**, n. 14, p. E24, 2017.
6. IDILMAN, I. S.; OZDENIZ, I.; KARCAALTINCABA, M. Hepatic Steatosis: Etiology, Patterns, and Quantification. **Semin Ultrasound CT MR**, v. 37, n. 6, p. 501-510, 2016.
7. DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-5, Apr 1998.
8. DAY, C. P.; JAMES, O. F. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party? **Hepatology**, v. 27, n. 6, p. 1463-6, 1998.
9. JOU, J.; CHOI, S. S.; DIEHL, A. M. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. **Semin Liver Dis**, v. 28, n. 4, p. 370-9, Nov 2008.
10. LONARDO, A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 36, p. 6571-6592, 2017.
11. TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-46, 2010.
12. LARRAIN, S.; RINELLA, M. E. A myriad of pathways to NASH. **Clin Liver Dis**, v. 16, n. 3, p. 525-48, 2012.
13. CORTEZ-PINTO, H. et al. Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome? **Clin Nutr**, v. 18, n. 6, p. 353-8, 1999.
14. GRANDER, C. et al. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Cause or Effect of Metabolic Syndrome. **Visc Med**, v. 32, n. 5, p. 329-334, 2016.
15. LONARDO, A. et al. Fatty liver is associated with an increased risk of diabetes and cardiovascular disease - Evidence from three different disease models: NAFLD, HCV and HIV. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 44, p. 9674-9693, 2016.
16. ROMEO, S. et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. **Nat Genet**, v. 40, n. 12, p. 1461-5, 2008.
17. YKI-JARVINEN, H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 2, n. 11, p. 901-10, 2014.
18. ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, p. 1059-1062, 2005.
19. GRUNDY, S. M. et al. Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. **Circulation**, v. 109, n. 3, p. 433-438, 2004.
20. ARMANI, A. et al. Molecular mechanisms underlying metabolic syndrome: the expanding role of the adipocyte. **FASEB J**, v. 31, n. 10, p. 4240-4255, 2017.
21. LONARDO, A. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. **Dig Liver Dis**, v. 47, n. 3, p. 181-90, 2015.
22. XU, L.; LAM, T. H. The Stage of Obesity Epidemic Model: Learning from Tobacco Control and Advocacy for a Framework Convention on Obesity Control. **J Diabetes**, 2018.

23. AL-DAYYAT, H. M.; RAYYAN, Y. M.; TAYYEM, R. F. Non-alcoholic fatty liver disease and associated dietary and lifestyle risk factors. **Diabetes Metab Syndr**, v. 12, n. 4, p. 569-575, 2018.
24. ALFAWAZ, H. A. et al. Effects of Different Dietary and Lifestyle Modification Therapies on Metabolic Syndrome in Prediabetic Arab Patients: A 12-Month Longitudinal Study. **Nutrients**, v. 10, n. 3, 2018.
25. ROSS, R.; DESPRES, J. P. Abdominal obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: contribution of physical activity/exercise. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17 Suppl 3, p. S1-2, 2009.
26. OK, D. P.; KO, K.; BAE, J. Y. Exercise without dietary changes alleviates nonalcoholic fatty liver disease without weight loss benefits. **Lipids Health Dis**, v. 17, n. 1, p. 018-0852, 2018.
27. WONG, V. W. et al. Beneficial effects of lifestyle intervention in non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 69, n. 6, p. 1349-1356, 2018.
28. ACSM. **ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription**. 9, ilustrada. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2014, 2014.
29. RAVEN, P. B. et al. **Exercise Physiology**. Cengage Learning, 2012. ISBN 9780495110248. Disponível em: <  
<https://books.google.com.br/books?id=SzL5WxrtN8EC>>. Acesso em: 29 de novembro 2018.
30. American College of Sports Medicine Position Stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 6, p. 975-91, 1998.
31. GARBER, C. E. et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 7, p. 1334-59, 2011.
32. KEATING, S. E. et al. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. **J Hepatol**, v. 57, n. 1, p. 157-66, 2012.
33. MEDRANO, M. et al. Evidence-Based Exercise Recommendations to Reduce Hepatic Fat Content in Youth- a Systematic Review and Meta-Analysis. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 61, n. 2, p. 222-231, 2018.
34. AVEZUM JÚNIOR, A. et al. Diretriz sul-americana de prevenção e reabilitação cardiovascular. **Arq bras cardiol**. São Paulo. v. 106, n. 2, supl 1 (ago. 2014), p. 1-31, 2014.
35. SIEGMUND, L. A. et al. The relationship between Metabolic Syndrome and adherence to cardiac rehabilitation. **Physiol Behav**, v. 169, p. 41-45, 2017.
36. RUANO-RAVINA, A. et al. Participation and adherence to cardiac rehabilitation programs. A systematic review. **Int J Cardiol**, v. 223, p. 436-443, 2016.
37. REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-1607, 1988.

38. FATTAHI, M. R. et al. The Prevalence of Metabolic Syndrome In Non-alcoholic Fatty Liver Disease; A Population-Based Study. **Middle East J Dig Dis**, v. 8, n. 2, p. 131-7, 2016.
39. SAMUEL, V. T. et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. **J Biol Chem**, v. 279, n. 31, p. 32345-53, 2004.
40. GLUVIC, Z. et al. Link between Metabolic Syndrome and Insulin Resistance. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 15, n. 1, p. 30-39, 2017.
41. VARGA, O. et al. Contribution of animal models to the understanding of the metabolic syndrome: A systematic overview. **Obes Rev**, v. 11, n. 11, p. 792-807, 2010.
42. SANTHEKADUR, P. K.; KUMAR, D. P.; SANYAL, A. J. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 68, n. 2, p. 230-237, 2018.
43. WONG, S. K. et al. Animal models of metabolic syndrome: a review. **Nutr Metab**, v. 13, p. 65-65, 2016.
44. WATERSTON, R. H. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. **Nature**, v. 420, n. 5, p. 520-562, 2002.
45. RUSSELL, J. C.; PROCTOR, S. D. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. **Cardiovascular Pathology**, v. 15, n. 6, p. 318-330, 2006.
46. FELLMANN, L. et al. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. **Pharmacology & therapeutics**, v. 137, n. 3, p. 331-340, 2013.
47. SÁINZ, N. et al. Leptin resistance and diet-induced obesity: Central and peripheral actions of leptin. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 1, p. 35-46, 2015.
48. JING, F.; MOGI, M.; HORIUCHI, M. Role of renin-angiotensin-aldosterone system in adipose tissue dysfunction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 378, n. 1-2, p. 23-28, 2013.
49. PRASAD, A.; QUYYUMI, A. A. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. **Circulation**, v. 110, n. 11, p. 1507-1512, 2004.
50. BADER, M. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: The other side of the coin. **Pflugers Arch.**, v. 465, n. 1, p. 79-85, 2013.
51. RABELO, L. A.; ALENINA, N.; BADER, M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. **Hypertens res**, v. 34, n. 2, p. 154-60, 2011.
52. SANTOS, S. H. et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 340-7, 2008.
53. HERNÁNDEZ-BAUTISTA, R. J. et al. Biochemical alterations during the obese-aging process in female and male monosodium glutamate (MSG)-treated mice. **Int J Mol Med Sci**, v. 15, n. 7, p. 11473-11494, 2014.
54. KINLEIN, S. A. et al. Chronic Corticosterone Treatment During Adolescence Has Significant Effects on Metabolism and Skeletal Development in Male C57BL6/N Mice. **Endocrinology**, v. 158, n. 7, p. 2239-2254, 2017.

55. AUGER, F. et al. Long-term risperidone treatment induces visceral adiposity associated with hepatic steatosis in mice: a magnetic resonance approach. **Schizophr Res Treatment**, v. 2014, p. 429291, 2014.
56. KARASAWA, H.; TAKAISHI, K.; KUMAGAE, Y. Obesity-induced diabetes in mouse strains treated with gold thioglucose: a novel animal model for studying  $\beta$ -cell dysfunction. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 3, p. 514-521, 2011.
57. FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 760-5, 2007.
58. EVANGELISTA, F. S.; BRUM, P. C.; KRIEGER, J. E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 12, p. 1751-1759, 2003.
59. CHOLEWA, J. et al. Basic models modeling resistance training: an update for basic scientists interested in study skeletal muscle hypertrophy. **J Cell Physiol**, v. 229, n. 9, p. 1148-56, 2014.
60. GOH, J.; LADIGES, W. Voluntary Wheel Running in Mice. **Curr Protoc Mouse Biol**, v. 5, n. 4, p. 283-90, 2015.
61. VERKHOVSKAYA, M.; BLOCH, D. A. Energy-converting respiratory Complex I: on the way to the molecular mechanism of the proton pump. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 2, p. 491-511, 2013.
62. ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 20-44, 2014.
63. BROWN, M. A. et al. Dietary Fat and Carbohydrate Composition: Metabolic Disease. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21452465> >. Acesso em: 29 de novembro 2018.
64. VAN EWIJK, P. A. et al. Effects of high-fat feeding on ectopic fat storage and postprandial lipid metabolism in mouse offspring. **Obesity (Silver Spring)**, v. 23, n. 11, p. 2242-50, 2015.
65. BUETTNER, R.; SCHÖLMEIRICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, n. 4, p. 798-808, 2007.
66. BASARANOGLU, M. et al. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 8, p. 1166-1172, 2013.
67. MARZZOCO, A. T., BAYARDO BAPTISTA. Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA. In: (Ed.). **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.3. ed, 2007.
68. KAWANISHI, N. et al. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 6, p. 931-41, 2012.
69. BIRKENFELD, A. L.; SHULMAN, G. I. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. **Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 713-23, Feb 2014.
70. SATAPATI, S. et al. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. **J Clin Invest**, v. 125, n. 12, p. 4447-62, 2015.

71. ISHIMOTO, T. et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. **Pnas**, v. 109, n. 11, p. 4320-5, 2012.
72. SHAPIRO, A. et al. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, n. 5, p. R1370-5, 2008.
73. SÁNCHEZ-LOZADA, L. G. et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 292, n. 1, p. F423-F429, 2007.
74. BORG, M. L. et al. Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice. **J Physiol**, v. 590, n. Pt 17, p. 4377-89, 2012.
75. SUGA, T. et al. Combination of exercise training and diet restriction normalizes limited exercise capacity and impaired skeletal muscle function in diet-induced diabetic mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 68-80, Jan 2014.
76. JORDY, A. B. et al. Analysis of the liver lipidome reveals insights into the protective effect of exercise on high-fat diet-induced hepatosteatosis in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 308, n. 9, p. E778-91, 2015.
77. KAWANISHI, N. et al. Exercise attenuates M1 macrophages and CD8+ T cells in the adipose tissue of obese mice. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 9, p. 1684-93, 2013.
78. KAWANISHI, N. et al. Exercise training attenuates adipose tissue fibrosis in diet-induced obese mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 440, n. 4, p. 774-9, 2013.
79. KAWANISHI, N. et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exerc Immunol Rev**, v. 16, p. 105-18, 2010.
80. DELDICQUE, L. et al. Endurance training in mice increases the unfolded protein response induced by a high-fat diet. **J Physiol Biochem**, v. 69, n. 2, p. 215-25, 2013.
81. YUAN, H. et al. Proteomic analysis of skeletal muscle in insulin-resistant mice: response to 6-week aerobic exercise. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53887, 2013.
82. VIEIRA, V. J. et al. Effects of diet and exercise on metabolic disturbances in high-fat diet-fed mice. **Cytokine**, v. 46, n. 3, p. 339-45, 2009.
83. VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E1164-71, 2009.
84. XU, X. et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 5, p. R1115-25, 2011.
85. HAFSTAD, A. D. et al. High- and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2287-94, 2013.

86. LEE, K. Y. et al. Effect of exercise on hepatic gene expression in an obese mouse model using cDNA microarrays. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 8, p. 1294-302, 2006.
87. DE FARIAS, J. M. et al. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. **Horm Metab Res**, v. 45, n. 3, p. 190-6, 2013.
88. FARIAS, J. M. et al. Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adipoR1-2/APPL1 protein levels in mice. **Lipids Health Dis**, v. 11, p. 134, 2012.
89. KIZAKI, T. et al. Voluntary exercise attenuates obesity-associated inflammation through ghrelin expressed in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 413, n. 3, p. 454-9, 2011.
90. LESNIEWSKI, L. A. et al. Aging compounds western diet-associated large artery endothelial dysfunction in mice: prevention by voluntary aerobic exercise. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 11, p. 1218-25, 2013.
91. HUANG, C. C. et al. Whole-body vibration training effect on physical performance and obesity in mice. **Int J Med Sci**, v. 11, n. 12, p. 1218-27, 2014.
92. BAYNARD, T. et al. Exercise training effects on inflammatory gene expression in white adipose tissue of young mice. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 767953, 2012.
93. WASINSKI, F. et al. Exercise and caloric restriction alter the immune system of mice submitted to a high-fat diet. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 395672, 2013.
94. CINTRA, D. E. et al. Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: the role of sterol regulatory element-binding protein-1c. **Life Sci**, v. 91, n. 11-12, p. 395-401, 2012.
95. MARQUES, C. M. et al. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 5, p. 467-75, 2010.
96. FU, L. et al. Effects of high-fat diet and regular aerobic exercise on global gene expression in skeletal muscle of C57BL/6 mice. **Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 146-52, 2012.
97. LIU, X. et al. The role of AMPK/mTOR/S6K1 signaling axis in mediating the physiological process of exercise-induced insulin sensitization in skeletal muscle of C57BL/6 mice. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 11, p. 1716-26, 2012.
98. NIU, Y.; YUAN, H.; FU, L. Aerobic exercise's reversal of insulin resistance by activating AMPKalpha-ACC-CPT1 signaling in the skeletal muscle of C57BL/6 mice. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 20, n. 5, p. 370-80, 2010.
99. BORG, M. L.; ANDREWS, Z. B.; WATT, M. J. Exercise training does not enhance hypothalamic responsiveness to leptin or ghrelin in male mice. **J Neuroendocrinol**, v. 26, n. 2, p. 68-79, 2014.
100. MARINHO, R. et al. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 7, p. 2917-26, 2012.

101. PAULI, L. S. et al. Exercise training decreases MAPK phosphatase-3 expression and suppresses hepatic gluconeogenesis in obese mice. **The Journal of physiology**, v. 6, p. 1325-1340, 2014.
102. SCHULTZ, A. et al. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. **Exp Toxicol Pathol**, v. 64, n. 4, p. 273-82, 2012.
103. WU, H. et al. Protective effects of aerobic swimming training on high-fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease: regulation of lipid metabolism via PANDER-AKT pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 458, n. 4, p. 862-8, 2015.
104. KELLY, S. et al. Exercise, weight loss, and changes in body composition in mice: phenotypic relationships and genetic architecture. **Physiological genomics**, v. 43, n. 50, p. 199-212, 2011.
105. HASHIMOTO, T.; SATO, K.; IEMITSU, M. Exercise-inducible factors to activate lipolysis in adipocytes. **J Appl Physiol (1985)**, v. 115, n. 2, p. 260-7, 2013.
106. MARTINEZ-HUENCHULLAN, S. F. et al. Differential metabolic effects of constant moderate versus high intensity interval training in high-fat fed mice: possible role of muscle adiponectin. **Physiol Rep**, v. 6, n. 4, p. 13599, 2018.
107. WANG, N. et al. High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. **Life Sci**, v. 191, p. 122-131, 2017.
108. POSNER, B. I. et al. Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: Tissue distribution, species variation and characterization. **Endocrinology**, v. 95, n. 2, p. 521-531, 1974.
109. MUKHERJEE, B. et al. Obesity and Insulin Resistance: An Abridged Molecular Correlation. **Lipid Insights**, v. 6, p. 1-1, 2013.
110. HAN, H. S. et al. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. **Exp Mol Med**, v. 11, n. 48, p. 122, 2016.
111. FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 7, p. 1746-1755, 2014.
112. SPAHIS, S. et al. Oxidative Stress as a Critical Factor in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 26, n. 10, 2017.
113. WAKIL, S. J.; ABU-ELHEIGA, L. A. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. **J Lipid Res**, p. R800079-JLR200, 2008.
114. PATON, C. M.; NTAMBI, J. M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 1, p. 28-37, 2009.
115. LI, L. et al. Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required. **Diabetes**, v. 60, n. 1, p. 157-67, 2011.
116. RODRIGUEZ, A. Novel molecular aspects of ghrelin and leptin in the control of adipobiology and the cardiovascular system. **Obes Facts**, v. 7, n. 2, p. 82-95, 2014.
117. GAIDHU, M. P. et al. Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, n. 19, p. 961-971, 2010.

118. CAMPBELL, J. E. et al. Endurance exercise training increases adipose tissue glucocorticoid exposure: adaptations that facilitate lipolysis. **Metabolism**, v. 58, n. 5, p. 651-60, 2009.
119. NISHIMURA, S. et al. CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 914-920, 2009.
120. MATTER, C. M.; STEIN, M. A. S. A dual role of CD4<sup>+</sup> T cells in adipose tissue? **Circ Res**, v. 104, n. 8, p. 928-930, 2009.
121. TREVISAN GRESSLER, L. et al. Ivermectina no tratamento de camundongos (*Mus musculus*) infestados por ácaros. **Acta Sci Vet**, v. 38, n. 1, 2010.
122. GUEDES, G. D. S. **Estudo hepático de um modelo murino dietético para Síndrome Metabólica: perfil morfológico, funcional e balanço redox.** (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas. 2009. 137p.
123. NUNES-SOUZA, V. et al. Aging Increases Susceptibility to High Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome in C57BL/6 Mice: Improvement in Glycemic and Lipid Profile after Antioxidant Therapy. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1987960, 2016.
124. MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-9, 1985.
125. SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metab Syndr Relat Disord**, v. 6, n. 4, p. 299-304, 2008.
126. CONCEA. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do Concea.** ANIMAL, C. N. D. C. D. E. Brasil: 54 p. 2013.
127. FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 3, p. 497-509, 1957.
128. WILSON, P. W. et al. Estimation of very-low-density lipoprotein cholesterol from data on triglyceride concentration in plasma. **Clinical chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2008-2010, 1981. ISSN 0009-9147.
129. HOSAKA, K. et al. A new colorimetric method for the determination of free fatty acids with acyl-CoA synthetase and acyl-CoA oxidase. **J Biochem**, v. 89, n. 6, p. 1799-803, 1981.
130. GIANNINI, E. et al. Progressive liver functional impairment is associated with an increase in AST/ALT ratio. **Dig Dis Sci**, v. 44, n. 6, p. 1249-1253, 1999.
131. NUNES-SOUZA, V. **Avaliação das alterações morfo-funcionais hepáticas e do balanço redox em um modelo murino para a síndrome metabólica induzida por uma dieta hipercalórica.** (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas. 2011. 101p.
132. IWASE, M. et al. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of canine leptin. **J Vet Med Sci**, v. 62, n. 2, p. 207-9, 2000.

133. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
134. MUKAKA, M. M. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Med J**, v. 24, n. 3, p. 69-71, 2012. ISSN 1995-7262.
135. IBRAHIMI, A.; ABUMRAD, N. A. Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 5, n. 2, p. 139-45, 2002.
136. HERTZEL, A. V.; BERNLOHR, D. A. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 5, p. 175-80, 2000.
137. ZHANG, G.; YU, P.; LIU, X. Swim Training Attenuates Inflammation and Improves Insulin Sensitivity in Mice Fed with a High-Fat Diet. **Int J Endocrinol**, v. 5940732, n. 10, p. 10, 2017.
138. SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol**, v. 4, p. 180-3, 2015.
139. PIAO, L. et al. Endogenous catalase delays high-fat diet-induced liver injury in mice. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 21, n. 3, p. 317-325, 2017.
140. WILSON, D. O.; JOHNSON, P. Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. **J Appl Physiol**, v. 88, n. 5, p. 1791-6, 1985.
141. ZACARIAS, A. C. et al. Swimming training induces liver adaptations to oxidative stress and insulin sensitivity in rats submitted to high-fat diet. **Redox Rep**, v. 22, n. 6, p. 515-523, 2017.
142. CONG, W. N. et al. The establishment of a novel non-alcoholic steatohepatitis model accompanied with obesity and insulin resistance in mice. **Life Sci**, v. 82, n. 19-20, p. 983-90, 2008.
143. KOONEN, D. P. et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 12, p. 2863-71, 2007.
144. OCKNER, R. K. et al. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. **Science**, v. 177, n. 4043, p. 56-8, Jul 7 1972.
145. HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1377-9, 1996.
146. PAN, X. et al. Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients. **Endocrine**, v. 48, n. 3, p. 834-47, 2015.
147. MUKAI, T. et al. Silencing of FABP1 ameliorates hepatic steatosis, inflammation, and oxidative stress in mice with nonalcoholic fatty liver disease. **FEBS Open Bio**, v. 7, n. 7, p. 1009-1016, 2017.
148. AKBAL, E. et al. Liver fatty acid-binding protein as a diagnostic marker for non-alcoholic fatty liver disease. **Wien Klin Wochenschr**, v. 128, n. 1-2, p. 48-52, Jan 2016.

149. CHOW, J. D. et al. Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation. **Mol Metab**, v. 3, n. 4, p. 419-31, 2014.
150. VERGÈS, B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia : where are we ? **Diabetologia**, v.58, n.5 p. 886-99, 2015.
151. MONLEON, D. et al. Metabolomic analysis of long-term spontaneous exercise in mice suggests increased lipolysis and altered glucose metabolism when animals are at rest. **J Appl Physiol**, v. 117, n. 10, p. 1110-19, 2014.
152. CUI, H.; LÓPEZ, M.; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nat Rev Endocrinol**, v.13, n.6, p.338-52, 2017.
153. ROTUNDO, L. et al. The Association of leptin with severity of non-alcoholic fatty liver disease: A population-based study. **Clin Mol Hepatol**, v. 2, n. 10, 2018.
154. POLYZOS, S. A. et al. Circulating leptin in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. **Diabetologia**, v. 59, n. 1, p. 30-43, 2016.
155. MIYAMOTO, L. et al. Leptin activates hepatic 5'AMP-Activated Protein Kinase through sympathetic nervous system and  $\alpha 1$  adrenergic receptor: A potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin. **J Biol Chem**, v.287, n. 48, p. 40441-7, 2012.
156. FISHMAN, S. et al. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 1, p. 53-60, 2007.
157. TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263-71, 1995.
158. MUOIO, D. M.; LYNIS DOHM, G. Peripheral metabolic actions of leptin. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 16, n. 4, p. 653-66, 2002.
159. IKEJIMA, K. et al. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatol res**, v. 33, n. 2, p. 151-154, 2005. ISSN 1386-6346.
160. MADDEN, C. J.; MORRISON, S. F. A high-fat diet impairs cooling-evoked brown adipose tissue activation via a vagal afferent mechanism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 311, n. 2, p. 28, 2016.
161. TAM, C. S.; LECOULTRE, V.; RAVUSSIN, E. Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets. **Circulation**, v. 125, n. 22, p. 2782-91, 2012.
162. THOONEN, R.; HINDLE, A. G.; SCHERRER-CROSBIE, M. Brown adipose tissue : The heat is on the heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 310, n. 11, p. H1592-605, 2016.
163. FLOURIS, A. D. et al. Exercise-induced effects on UCP1 expression in classical brown adipose tissue: A systematic review. **Horm Mol Biol Clin Investig**, v. 31, n. 2, p. 1-13, 2017.
164. COMMINS, S. P. et al. Norepinephrine is required for leptin effects on gene expression in brown and white adipose tissue. **Endocrinology**, v. 140, n. 10, p. 4772-4778, 1999.
165. BACHMAN, E. S. beta AR Signaling Required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 843-845, 2002.

166. COMMINS, S. P. et al. Central leptin regulates the UCP1 and ob genes in brown and white adipose tissue via different  $\beta$ -adrenoceptor subtypes. **J Biol Chem**, v. 275, n. 42, p. 33059-67, 2000.

**APÊNDICE A – Descrição dos protocolos experimentais empregados em cada estudo analisado na revisão de literatura**

**Protocolos de treinamento de corrida em esteira motorizada**

<b>Estudo</b>	<b>Animais</b>	<b>Intervenção</b>	<b>Dietas</b>	<b>Protocolo de exercício</b>
Vieira <i>et al.</i> , 2009 <sup>82</sup>	Camundongos Balb/cByJ machos	Todos os camundongos consumiram HFD por 12 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 10% de Kcal de lipídios  HFD: 60% de Kcal de lipídios	Tempo: 60 min/dia; 5x/semana  Inclinação: 5%  Velocidade: 12 m/min  Duração: 12 semanas
Vieira <i>et al.</i> , 2009 <sup>83</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Todos os camundongos consumiram HFD por 6 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 10% de Kcal de lipídios  HFD: 45% de Kcal de lipídios	Tempo: 40 min/dia; 5x/semana  Inclinação: 12%  Velocidade: 12 m/min  Duração: 6 ou 12 semanas
Kawanishi <i>et al.</i> , 2010 <sup>79</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 13% de Kcal de lipídios  HFD: 60% de Kcal de lipídios	Tempo: 60 min/dia; 5x/semana  Inclinação: ND  Velocidade: 20 m/min  Duração: 16 semanas

Marques <i>et al.</i> , 2010 <sup>95</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 8 semanas. Posteriormente foram alocados em 6 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício 5. HFD/ Dieta padrão 6. HFD/ Dieta padrão + exercício	Dieta padrão: 10% de Kcal de lipídios HFD: 60% de Kcal de lipídios	Tempo: 60 min/dia; 5x/semana Inclinação: ND Velocidade: 16,7 m/min Duração: 8 semanas
Niu <i>et al.</i> , 2010 <sup>98</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 8 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dados não disponíveis	Tempo: 60 min/dia; 5x/semana Inclinação: ND Velocidade: 12 m/min Duração: 6 semanas
Xu <i>et al.</i> , 2011 <sup>84</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 17% de Kcal de lipídios HFD: 42% de Kcal de lipídios	Tempo: 40 min/dia; 5x/semana Inclinação: 12% Velocidade: 15 m/min Duração: 8 semanas

Baynard <i>et al.</i> , 2012 <sup>92</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 6 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 17% de Kcal de lipídios HFD: 45% de Kcal de lipídios	Tempo: 40 min/dia; 5x/semana Inclinação: 12% Velocidade: 12 m/min Duração: 6 semanas
Borg <i>et al.</i> , 2012 <sup>74</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 6 semanas. Posteriormente foram alocados em 3 grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. HFD + exercício	Dieta padrão: 5% de Kcal de lipídios HFD: 59% de Kcal de lipídios	Tempo: 30 a 70 min/dia; 5x/semana Inclinação: ND Velocidade: 19 m/min Duração: 6 semanas
Cintra <i>et al.</i> , 2012 <sup>94</sup>	Camundongos swiss machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 8 semanas. Posteriormente foram alocados em 3 grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. HFD + exercício	Dados não disponíveis	Tempo: 50 min/dia; 5x/semana Inclinação: ND Velocidade: 16,7 m/min Duração: 8 semanas
Kawanishi <i>et al.</i> , 2012 <sup>68</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício	Dieta padrão: 10% de Kcal de lipídios HFFrD: 59% de Kcal de lipídios + 21%	Tempo: 60 min/dia; 5x/semana Inclinação: ND Velocidade: 20 m/min

		3. HFFrD 4. HFFrD + exercício	(wt/V) de frutose	Duração: 16 semanas
Fu <i>et al.</i> , 2012 <sup>96</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 8 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dados não disponíveis	Tempo: 60 min/dia; 5x/semana Inclinação: ND Velocidade: 12 m/min Duração: 6 semanas
Liu <i>et al.</i> , 2012 <sup>97</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 10 semanas. Posteriormente foram alocados em 3 grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. HFD + exercício	Dieta padrão: ND HFD: 45% de Kcal de lipídios	Tempo: 60 min/dia; 5x/semana Inclinação: ND Velocidade: 12 m/min Duração: 6 semanas
Deldicque <i>et al.</i> , 2013 <sup>80</sup>	Camundongos C57Bl/6 fêmeas	Os camundongos foram alocados em 3 grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. HFD + exercício	Dieta padrão: ND HFD: 72% de Kcal de lipídios	Tempo: 60 min/dia; 5x/semana Inclinação: 0% Velocidade: 12 m/min Duração: 6 semanas
Hafstad <i>et al.</i> , 2013 <sup>85</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Todos os camundongos consumiram HFD por 9 semanas. Posteriormente a dieta foi modificada para PWD e	HFD: 60% of Kcal de lipídios PWD: 35% of Kcal de lipídios	Inclinação: 25% Duração: 10 semanas HIT

		<p>os animais alocados em 3 grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. PWD</li> <li>2. PWD + exercício (HIT)</li> <li>3. PWD + Exercício (MIT)</li> </ol>		<p>Tempo: 10 tiros de 4 min intercalado com 2 min de descanso ativo; 5 x/semana Velocidade: 12 to 23 m/min</p> <p>MIT Tempo: 120 min/dia; 5 x/semana Velocidade: 7,5 to 10 m/min</p>
Kawanishi <i>et al.</i> , 2013 <sup>77</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	<p>Os camundongos foram alocados em 4 grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dieta padrão</li> <li>2. Dieta padrão + exercício</li> <li>3. HFD</li> <li>4. HFD + exercício</li> </ol>	<p>Dieta padrão: 10% de Kcal de lipídios</p> <p>HFD: 60% de Kcal de lipídios</p>	<p>Tempo: 60 min/dia; 5x/semana</p> <p>Inclinação: ND</p> <p>Velocidade: 20 m/min</p> <p>Duração: 16 semanas</p>
Kawanishi <i>et al.</i> , 2013 <sup>78</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	<p>Os camundongos foram alocados em 4 grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dieta padrão</li> <li>2. Dieta padrão + exercício</li> <li>3. HFD</li> <li>4. HFD + exercício</li> </ol>	<p>Dieta padrão: 10% de Kcal de lipídios</p> <p>HFD: 60% de Kcal de lipídios</p>	<p>Tempo: 60 min/dia; 5x/semana</p> <p>Inclinação: ND</p> <p>Velocidade: 20 m/min</p> <p>Duração: 16 semanas</p>
Yuan <i>et al.</i> , 2013 <sup>81</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	<p>Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 10 semanas. Posteriormente foram alocados em 3</p>	<p>Dieta padrão: ND</p> <p>HFD: 45% de Kcal de lipídios</p>	<p>Tempo: 60 min/dia; 5x/semana</p> <p>Inclinação: 0%</p>

		<p>grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dieta padrão</li> <li>2. HFD</li> <li>3. HFD + exercício</li> </ol>		<p>Velocidade: 12 m/min</p> <p>Duração: 7 semanas</p>
Borg <i>et al.</i> , 2014 <sup>99</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	<p>Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 6 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dieta padrão</li> <li>2. Dieta padrão + exercício</li> <li>3. HFD</li> <li>4. HFD + exercício</li> </ol>	<p>Dieta padrão: 6% de Kcal de lipídios</p> <p>HFD: 36% de Kcal de lipídios</p>	<p>Tempo: 70 min/dia; 5x/semana</p> <p>Inclinação: 5%</p> <p>Velocidade: 18 m/min</p> <p>Duração: 6 semanas</p>
Jordy <i>et al.</i> , 2015 <sup>76</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	<p>Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 4 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dieta padrão</li> <li>2. Dieta padrão + exercício</li> <li>3. HFD</li> <li>4. HFD + exercício</li> </ol>	<p>Dieta padrão: 5% de Kcal de lipídios</p> <p>HFD: 43% de Kcal de lipídios</p>	<p>Tempo: 60 min/dia; 5x/semana</p> <p>Inclinação: ND</p> <p>Velocidade: ND (selecionada a partir de 50% até 80% da velocidade máxima no teste de capacidade de exercício)</p> <p>Duração: 4 semanas</p>
Wang <i>et al.</i> , 2017 <sup>107</sup>	Camundongos endogâmicos ICR	<p>Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 4 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos:</p>	<p>Dieta padrão: 10% de Kcal de lipídios</p> <p>HFD: 45% de Kcal de lipídios</p>	<p>Inclinação: 25%</p> <p>Duração: 8 semanas</p> <p>HIT</p>

		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dieta padrão</li> <li>2. HFD + exercício (ECMI)</li> <li>3. HFD + exercício (HIT)</li> </ol>	lipídios	<p>Tempo: 10 tiros (85% - 90% do VO<sub>2</sub> max) de 4 min intercalado com 2 min de descanso ativo; 5 x/semana          Velocidade: 16 a 26 m/min</p> <p>MIT          Tempo: (85% - 90% do VO<sub>2</sub> max); 5 x/semana          Velocidade: 9 to 13 m/min</p>
Martinez-Huenchullan <i>et al.</i> , 2018 <sup>106</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	<p>Os camundongos foram alocados em 6 grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dieta padrão</li> <li>2. Dieta padrão + exercício (MIT)</li> <li>3. Dieta padrão + exercício (HIT)</li> <li>4. HFD</li> <li>5. HFD + exercício (MIT)</li> <li>6. HFD + exercício (HIT)</li> </ol>	<p>Dieta padrão: 12% de Kcal de lipídios</p> <p>HFD: 45% de Kcal de lipídios</p>	<p>Inclinação: 25%          Duração: 10 semanas</p> <p>HIT          Tempo: 8 tiros (90% da CMC) de 2,5 min intercalado com 2,5 min de descanso ativo; 5 x/semana          Velocidade: 22 m/min</p> <p>MIT          Tempo: 40 minutos (70% da CMC); 5 x/semana          Velocidade: 17 m/min</p>

CMC: capacidade máxima de corrida; HFD: dieta hiperlipídica; HFFrD: dieta hiperlipídica associada a água com alto teor de frutose; PWD: dieta ocidental palatável; HIT: treino intervalado de alta intensidade; MIT: treino contínuo de intensidade moderada; ND: não descrito no estudo.

## Protocolos de treinamento de natação

Estudo	Animais	Intervenção	Dietas	Protocolo de exercício
Lee, <i>et al.</i> , 2006 <sup>86</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos foram alocados em 3 grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. HFD + exercício	Dieta padrão: 4% de Kcal de lipídios HFD: 35% de Kcal de lipídios	Tempo: 60 min/dia; 7x /semana Fluxo: 4L/min Carga: ND Duração: 12 semanas
de Farias <i>et al.</i> , 2012 <sup>87</sup>	Camundongos swiss machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 4 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 3948 Kcal.Kg <sup>-1</sup> HFD: 5358 Kcal.Kg <sup>-1</sup>	Tempo: 2 sessões de 30 min separadas por 5 min de descanso; 5 x/semana Fluxo: ND Carga: 5% da massa corporal Duração: 8 semanas
Farias <i>et al.</i> , 2012 <sup>88</sup>	Camundongos swiss machos	Os camundongos foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 3948 Kcal.Kg <sup>-1</sup> HFD: 5358 Kcal.Kg <sup>-1</sup>	Tempo: 2 sessões de 30 min separadas por 5 min de descanso; 5 x/semana Fluxo: ND Carga: ND Duração: 12 semanas
Marinho <i>et al.</i> , 2012 <sup>100</sup>	Camundongos swiss machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 8 semanas. Posteriormente foram alocados em 3 grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. HFD + exercício	Dieta padrão: 3948 Kcal.Kg <sup>-1</sup> HFD: 5358 Kcal.Kg <sup>-1</sup>	Tempo: 60 min/dia; 5x /semana Fluxo: ND Carga: 5% da massa corporal Duração: 8 semanas

Schultz <i>et al.</i> , 2012 <sup>102</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 12 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 10% de Kcal de lipídios HFD: 60% de Kcal de lipídios	Tempo: 60 min/dia; 5x /semana Fluxo: ND Carga: ND Duração: 10 semanas
Wasinski <i>et al.</i> , 2013 <sup>93</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 16 semanas. Posteriormente foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. Restrição calórica 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 6% de Kcal de lipídios HFD: 45% de Kcal de lipídios Restrição calórica: 30% da HFD	Tempo: 60 min/dia; 5x /semana Fluxo: ND Carga: ND Duração: 6 semanas
Pauli <i>et al.</i> , 2014 <sup>101</sup>	Camundongos swiss machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 8 semanas. Posteriormente foram alocados em 6 grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. HFD + antiMKP-3 4. HFD + MKP-3 5. HFD + exercício 6. HFD + exercício + antiMKP-3	Dieta padrão: 3948 Kcal.Kg <sup>-1</sup> HFD: 5358 Kcal.Kg <sup>-1</sup>	Tempo: 60 min/dia; 5x /semana Fluxo: ND Carga: 5% da massa corporal Duração: 8 semanas
Suga <i>et al.</i> , 2014 <sup>75</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD ou dieta padrão por 8 semanas. Posteriormente foram alocados em 5	Dados não disponíveis	Tempo: 90 min/dia; 5x /semana Fluxo: ND

		grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. HFD + exercício 4. Restrição calórica 5. Restrição calórica + exercício		Carga: ND Duração: 4 semanas
Wu <i>et al.</i> , 2015 <sup>103</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos foram alocados em 4 grupos: 1. Dieta padrão 2. Dieta padrão + exercício 3. HFD 4. HFD + exercício	Dieta padrão: 10% de Kcal de lipídios HFD: 60% de Kcal de lipídios	Tempo: 60 min/dia; 5x /semana Fluxo: ND Carga: ND Duração: 12 semanas

HFD: dieta hiperlipídica; ND: não descrito no estudo; antiMPK-3: tratamento com antisense para mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 oligonucleotide; MKP-3: tratamento com sense para mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 oligonucleotide.

**Protocolos de exercício voluntário**

<b>Estudo</b>	<b>Animais</b>	<b>Intervenção</b>	<b>Dietas</b>	<b>Protocolo de exercício</b>
Kizaki et al., 2011 <sup>89</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos foram alocados em 3 grupos: 1. Dieta padrão 2. HFD 3. HFD + exercício	Dieta padrão: 10,6% de Kcal de lipídios HFD: 56,7% de Kcal de lipídios	24 horas de acesso livre a rodas de corrida individuais  Duração: 6 semanas
Lesniewski et al., 2013 <sup>90</sup>	Camundongos B6D2F1 machos	Os camundongos foram alocados em 6 grupos: 1. Jovem em dieta padrão 2. Idoso em dieta padrão 3. Jovem em PWD 4. Idoso em PWD 5. Jovem em PWD + exercício 6. Idoso em PWD + exercício	Dieta padrão: 17% de Kcal de lipídios PWD: 40% de Kcal de lipídios e 19% de sacarose/Kg	24 horas de acesso livre a rodas de corrida individuais  Duração: 10-14 semanas

HFD: dieta hiperlipídica; PWD: dieta ocidental palatável.

### Protocolos de treinamento com plataforma vibratória de corpo inteiro

<b>Estudo</b>	<b>Animais</b>	<b>Intervenção</b>	<b>Dietas</b>	<b>Protocolo de exercício</b>
Huang et al., 2014 <sup>91</sup>	Camundongos C57Bl/6 machos	Os camundongos consumiram HFD por 4 semanas. Posteriormente foram alocados em 3 grupos:  1. HFD 2. HFD + exercício (LIWBV) 3. HFD + exercício (HIWBV)	Dieta padrão: 13,4 % de Kcal de lipídios HFD: 33,4% de Kcal de lipídios	Tempo: 15min/dia; 5x/semana Duração: 6 semanas Amplitude de vibração: 2mm  LIWBV Frequência da vibração: 5,6 Hz Aceleração: 0,13 g  HIWBV Frequência da vibração: 13 Hz Aceleração: 0,68 g

HFD: dieta hiperlipídica; LIWBV: vibração de baixa intensidade; HIWBV: vibração de alta intensidade.

## ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Exercício físico e síndrome metabólica: repercussões fisiopatológicas e participação do eixo NO/arginase/equilíbrio redox em um modelo murino-dietético.”, **Protocolo nº 63/2015**, sob a responsabilidade de **Luiza Anta Rabêlo**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 13/11/2015.

Vigência do Projeto	01.12.2015 a 01.12.2018
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico/ C57BL/6
Nº de animais	90
Peso/idade	4 a 6 semanas de idade
Sexo	Machos
Origem/Local de Manutenção	Biotério Central da UFAL/Laboratório experimental do Laboratório de Reatividade cardiovascular (LRC/ICBS – UFAL)

Maceió, 19 de novembro de 2015.

  
Prof. Dr. Silvana Ayres Martins  
Coordenadora CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins  
Coordenadora da Comissão de  
Ética no uso de Animais  
SIAPE 1120858