

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS UFSCar**

**VANESSA DE OLIVEIRA FURINO**

**MODULAÇÃO DE IRISINA, COMPOSIÇÃO CORPORAL, E PARÂMETROS  
METABÓLICOS EM RATOS *WISTAR* OBESOS EXÓGENOS FRENTE AO  
PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBICO E/OU INTERVENÇÃO DIETÉTICA**

**SÃO CARLOS-SP**

**2021**

**VANESSA DE OLIVEIRA FURINO**

**MODULAÇÃO DE IRISINA, COMPOSIÇÃO CORPORAL, E PARÂMETROS  
METABÓLICOS EM RATOS *WISTAR* OBESOS EXÓGENOS FRENTE AO  
PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBICO E/OU INTERVENÇÃO DIETÉTICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

**Área de concentração:** Ciências Fisiológicas

**Orientadora:** Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte

**SÃO CARLOS-SP**

**2021**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

# FOLHA DE APROVAÇÃO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Vanessa de Oliveira Furino, realizada em 17/05/2021.

### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte (UFSCar)

Profa. Dra. Marcela Sene Fiorese (Anhanguera)

Profa. Dra. Fernanda Oliveira Duarte (USP)

Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro (UFSCar)

Profa. Dra. Marina Campos Rocha (UFSCar)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico essa tese em memória do patriarca da família, meu amado avô Vicente Furino, que sempre encarou os desafios da vida com leveza e sorriso largo. Saudades eternas de um grande homem que se foi, mas deixou suas histórias e ensinamentos vivos entre nós.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me conferir a missão de pesquisar e estudar em busca de um mundo melhor.

Aos meus amados pais Fernanda e Ângelo, por me criarem e incentivarem a educação como transformadora da realidade, por trazerem conforto e generosidade quando precisei, por serem meu porto seguro quando me senti desamparada, por me orientar nos momentos de dificuldade e me apoiar durante todas as decisões e escolhas profissionais e pessoais.

Ao meu padrinho e tio Luís, avós Esmeralda e Ângela, madrinha Elizabeth e toda a minha família por me acolher, permanecer ao meu lado nas conquistas e dificuldades e serem sempre disponíveis fisicamente e emocionalmente durante todo esse processo.

À minha irmã Fernanda de Oliveira Furino, por ser minha fortaleza, meu equilíbrio nessa etapa, que colaborou ativamente com essa pesquisa. Por sempre estar ao meu lado me aconselhando, encorajando, e ser essencial para a conclusão do meu doutoramento.

À Profa. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte, pela orientação, compreensão, paciência e responsabilidade ética com o projeto, por me ensinar e me apoiar durante todos os desafios e obstáculos que perpassaram por essa pesquisa, por depositar em mim a confiança de realizar esse trabalho e compartilhar o conhecimento da experiência clínica e em pesquisa.

À professora Carla Roberta de Oliveira Carvalho, pela co-orientação, responsabilidade ética com o projeto, por oferecer seu apoio durante as etapas, supervisionar o trabalho, compartilhar o conhecimento para qualificar este trabalho.

To professor Anastasia Kralli (*Johns Hopkins University*), supervisor of the sandwich PhD, a brilliant researcher and scientist, who was sharing with me techniques of molecular biology and genetics. I am grateful for the trust to share all knowledge and actively contribute to this process.

To my colleagues and friends from Kralli's lab (*Johns Hopkins University*) Elodie Eury, Jean-Sebastien Wattez, Sarah Chau, Miguel Tellez, Isaac and Jéssica Alves Medeiros Araújo, who were essential in my process of adaptation to the laboratory, provided assistance whenever I needed to perform molecular biology and genetics techniques and actively contributed to the PhD journey.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição e Metabolismo, Carla Nascimento dos Santos Rodrigues, Diego Adorna Marine, Jeferson Américo Ancelmo Teixeira, Marco Antônio de Lima, Marcela Sene-Fiorese, João Manoel Alves, Phelipe Henrique Cardoso de Castro, Jean Cesar de Andrade, Jean Lucas Fernandes da Costa, Valter Mariano dos Santos e ao técnico José Alves, por tornarem possível o desenvolvimento desse trabalho e colaborarem de forma ativa para a execução dos protocolos experimentais.

Ao Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra por auxiliar a avaliação das lâminas histológicas no Laboratório de Imunologia Aplicada, e as análises estatísticas dessa pesquisa.

Às Profa. Dra. Stela Márcia Mattiello e à Dra. Cristina Arrais-Lima, do Laboratório de Análise da Função Articular, por contribuírem com as análises da composição corporal através do equipamento DEXA.

Ao Prof. Dr. Iran Malavazzi, do Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada, por auxiliar no desenvolvimento da técnica de *Western Blotting* e permitir utilizar a infraestrutura do laboratório. Especialmente à Dra. Marina Rocha e João Fabri que compartilharam todo o conhecimento sobre biologia molecular e genética e auxiliaram nas técnicas desenvolvidas nesse projeto.

Ao Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck, por contribuir com a qualificação e com as análises estatísticas desse trabalho.

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, Dr<sup>a</sup>. Uliana Sbeguen Stotzer, a Bianca Caruso do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular por auxiliarem na extração e quantificação e pela disponibilidade em usar a infraestrutura do seu laboratório;

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Aníbal e especialmente Cynthia Aparecida de Castro, do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas por permitirem e auxiliarem no desenvolvimento da técnica de ELISA.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. E em parte pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2017/09602-4).

## EPÍGRAFE

*“O mundo precisa da ciência e a ciência precisa das mulheres”*

Irina Bokova



## RESUMO

A obesidade é uma doença caracterizada pela expansão do tecido adiposo, que promove a secreção de fatores que levam a comorbidades, como diabetes e doenças cardiovasculares. Nesse sentido, a intervenção dietética e exercício físico têm sido propostos como estratégias para atenuar essas complicações. Dessa forma, este trabalho objetivou determinar a modulação da irisina/FNDC5, dos marcadores bioquímicos e dos depósitos viscerais em resposta à intervenção dietética e treinamento. Para tal, ratos *Wistar* foram alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) durante 8 semanas para indução da obesidade. A partir da 8ª semana os animais foram divididos em 4 grupos: HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. Os grupos treinados foram submetidos ao exercício aeróbico na esteira por 4-8 semanas, 3x/semana, por 60 minutos. Ao final do protocolo foram coletados o soro, o fígado, pâncreas, tecidos adiposos: MES (mesentérico), EPI (epididimal), RET (retroperitoneal) e marrom (TAM) e os músculos gastrocnêmio, sóleo e extensor longo dos dedos (EDL). A área e diâmetro dos depósitos viscerais e a esteatose hepática foram determinadas por análise de lâminas histológicas. A massa corporal (MC), o percentual de gordura corporal (%GC), área corporal (AC), massa livre de gordura (MLG), massa de gordura (MGC), densidade mineral óssea (DMO) foram determinados por DEXA. As concentrações séricas de IL-1 $\beta$ , IL-10, leptina e irisina foram determinadas por ELISA. O HDL, triglicérides (TG), glicemia, insulina e HOMA-IR foram determinadas. A expressão da proteína FNDC5 no músculo gastrocnêmio foi avaliada por *Western blotting*. Nossos resultados mostraram que a dieta hiperlipídica promoveu o fenótipo obeso em 8 semanas ao elevar a MC, %GC, MGC, EPI, RET e MES, glicemia e irisina. Após 4 semanas, a intervenção dietética foi o fator mais importante na redução da MC, %GC e MGC, leptina e glicemia, sem efeitos sobre a irisina e IL-10, mas elevou o FNDC5. Ademais, os efeitos foram mantidos após 8 semanas. O treinamento físico também atenuou as disfunções oriundas da obesidade, mas as alterações foram mais evidentes após 8 semanas, através da redução do EPI, RET e MES e IL-1 $\beta$ . No entanto, a expressão de FNDC5 e irisina, foram reduzidos. Já a combinação das intervenções mostrou respostas semelhantes a intervenção dietética, após 4 e 8 semanas. Além disso, os depósitos viscerais responderam de forma diferente, e a massa do EPI foi modulado por todas as intervenções apenas após 8 semanas. Já a área de adipócitos do EPI, MES e RET foram reduzidas significativamente frente a combinação das intervenções. De modo geral, a intervenção dietética promove efeitos superiores ao treinamento físico nos parâmetros gerais associados à adiposidade visceral e composição corporal, enquanto o exercício físico atua na prevenção do declínio da massa muscular. Por fim, a combinação de treinamento aeróbico e intervenção dietética resultam em uma tendência para potencializar os efeitos das intervenções, especialmente na diminuição da adiposidade visceral. Ainda, destacamos que a irisina pode ser utilizada como um marcador bioquímico da obesidade e o FNDC5 como um potencial indicador de obesidade sarcopênica.

**Palavras chaves:** Obesidade; Irisina/FNDC5; Dieta hiperlipídica; Tecido adiposo visceral; Exercício físico.

## ABSTRACT

Obesity is a disease characterized by the expansion of adipose tissue, which promotes the secretion of factors that lead to comorbidities, such as diabetes and cardiovascular disease. In this sense, dietary intervention and physical exercise have been proposed as strategies to alleviate these complications. Thus, this work aimed to determine the modulation of irisin/FNDC5, biochemical markers and visceral depots in response to dietary intervention and training. For this purpose, Wistar rats were fed a high-fat diet (HFD) for 8 weeks to induce obesity. From the 8th week, the animals were divided into 4 groups: HFD-Ex: trained high-fat diet group; HFD-Sed: sedentary high-fat diet group; CD-Ex: trained chow-diet group; CD-Sed: sedentary chow-diet group. The trained groups were submitted to aerobic exercise on a treadmill for 4-8 weeks, 3x/week, for 60 minutes. At the end of the protocol, serum, liver, pancreas, adipose tissues were collected: MES (mesenteric), EPI (epididymal), RET (retroperitoneal) and brown (TAM) and the gastrocnemius, soleus and extensor digitorum longus (EDL). The area and diameter of visceral depots and hepatic steatosis were determined by analysis of histological slides. Body mass (BM), percentage of body fat (%BF), body area (BA), fat-free mass (FFM), fat mass (FM), bone mineral density (BMD) were determined by DXA. Serum concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-10, leptin and irisin were determined by ELISA. The HDL, triglycerides (TG), blood glucose, insulin and HOMA-IR were determined. The expression of FNDC5 protein in the gastrocnemius muscle was evaluated by Western blotting. Our results showed that the high-fat diet promoted the obese phenotype in 8 weeks by increasing the BM, %BF, FM, EPI, RET and MES, blood glucose and irisin. After 4 weeks, dietary intervention was the most important factor in reducing BM, %BF and FM, leptin and glycemia, with no effects on irisin and IL-10, but it increased FNDC5. Furthermore, the effects were maintained after 8 weeks. Physical training also attenuated the disorders arising from obesity, but the changes were more evident after 8 weeks, through the reduction of EPI, RET and MES and IL-1 $\beta$ . However, the expression of FNDC5 and irisin were reduced. The combination of interventions showed similar responses to dietary intervention, after 4 and 8 weeks. Furthermore, visceral depots responded differently, and EPI mass was modulated by all interventions only after 8 weeks. The adipocyte area of EPI, MES and RET were significantly reduced due to the combination of interventions. In general, dietary intervention promotes greater effects than physical training on general parameters associated with visceral adiposity and body composition, while physical exercise acts to prevent the decline in muscle mass. Finally, the combination of aerobic training and dietary intervention results in a tendency to potentiate the effects of interventions, especially in decreasing visceral adiposity. Furthermore, we emphasize that irisin can be used as a biochemical marker of obesity and FNDC5 as a potential indicator of sarcopenic obesity.

**Key words:** Obesity; Irisin/FNDC5; High-fat diet; Visceral adipose tissue; Physical exercise.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo molecular de indução termogênica e cascatas de sinalização celular nos adipócitos.....	34
Figura 2 - Estrutura do FNDC5/ Irisina.....	36
Figura 3 - O mecanismo proposto como ação da irisina em adipócitos. ....	39
Figura 4 - Esquema representativo dos grupos, protocolos experimentais e eutanásia.....	56
Figura 5 - Protocolo de adaptação e treinamento dos animais. ....	59
Figura 6 - Análise das secções histológicas do tecido hepático. ....	65
Figura 7 - Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a massa corporal e no consumo alimentar durante 8 semanas.....	68
Figura 8 - Valores séricos de irisina e expressão proteica de FNDC5. ....	72
Figura 9 - Correlação de Spearman entre irisina e FNDC5 e características gerais do estudo de acordo com os grupos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) e dieta padrão (CD) após 8 semanas.....	73
Figura 10 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício nos depósitos do tecido adiposo e consumo alimentar.....	88
Figura 11 - Efeitos da intervenção dietética e exercício na composição corporal. ....	90
Figura 12 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício sobre os compartimentos do músculo esquelético, fígado e pâncreas. ....	92
Figura 13 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício sobre o perfil glicêmico e lipídico....	94
Figura 14 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício sobre os níveis séricos de adipocitocinas. ....	96
Figura 15 – Fotomicrografia e morfometria do tecido hepático após 8 semanas de intervenção dietética e exercício. ....	98
Figura 16 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício sobre a expressão de FNDC5 no músculo gastrocnêmio.....	99
Figura 17 - Fotomicrografia e morfometria do tecido adiposo após 8 semanas de intervenção dietética e exercício. ....	100
Figura 18 - Frequência relativa (%) da área dos adipócitos EPI, RET e MES após 8 semanas de intervenção dietética e exercício.....	102

Figura 19 - Correlação de Spearman entre irisina/FNDC5 e características gerais do estudo após 4 semanas de intervenção dietética e exercício. ....	104
Figura 20 - Correlação de Spearman entre irisina e FNDC5 e características gerais do estudo após 8 semanas de intervenção dietética e exercício. ....	105

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais atividades fisiológicas mediadas por FNDC5/Irisina.....	41
Tabela 2 - Composição centesimal da dieta .....	55
Tabela 3 - Protocolo de adaptação na esteira .....	57
Tabela 4 - Medida para avaliação do desempenho dos animais durante a adaptação .....	57
Tabela 5 - Composição corporal dos animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 8 semanas. ....	69
Tabela 6 - Massa dos tecidos dos animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 8 semanas.....	70
Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos dos animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 8 semanas. ....	70
Tabela 8- Adipocitocinas dos animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 8 semanas.....	71
Tabela 9- Protocolo de teste máximo .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AC.</b>	Área Corporal
<b>AGL.</b>	Ácidos Graxos Livres
<b>AMP.</b>	Proteína quinase ativada por AMP (do inglês <i>AMP-Activated Protein kinase</i> )
<b>ATGL.</b>	Lipase de Triacilglicerol do Adipócito (do inglês <i>Adipose Triglyceride Lipase</i> )
<b>ATP.</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CD.</b>	Dieta padrão (do inglês <i>Chow Diet</i> )
<b>CT.</b>	Colesterol Total
<b>DM2.</b>	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo II
<b>DMO.</b>	Densidade Mineral Óssea
<b>DEXA.</b>	Densitometria por Dupla Emissão de Raio x (do inglês <i>Dual-Energy X-Ray Absorptiometry</i> )
<b>EDL.</b>	Extensor longo dos dedos (do inglês <i>Extensor Digitorum Longus</i> )
<b>ELISA.</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>EPI.</b>	Tecido adiposo epididimal
<b>EPM.</b>	Erro Padrão da Média
<b>ERK.</b>	Quinase Regulada por Sinal Extracelular (do inglês <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> )
<b>Ex.</b>	Exercício
<b>FNDC5.</b>	Fibronectina tipo III- Contendo Domínio 5 (do inglês <i>Fibronectin Type III Domain-Containing Protein 5</i> )
<b>g</b>	Gramas
<b>GC.</b>	Gordura corporal
<b>GLUT-4.</b>	Transportador de glicose 4
<b>HDL.</b>	Lipoproteína de Alta Densidade (do inglês <i>High Density Lipoprotein</i> )
<b>HFD.</b>	Dieta hiperlipídica (do inglês <i>High-Fat Diet</i> )

<b>HOMA-IR.</b>	Modelo de Avaliação da Homeostase de Resistência à Insulina (do inglês <i>Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance</i> )
<b>HSL.</b>	Lipase Hormônio Sensível (do inglês <i>Hormone-Sensitive Lipase</i> )
<b>Ikk-β.</b>	Inibidor da subunidade beta do fator nuclear kappa- beta
<b>IL-1β.</b>	Interleucina-1 beta
<b>IL-10.</b>	Interleucina-10
<b>IMC.</b>	Índice de Massa Corporal
<b>IRS-1.</b>	Substrato-1 do Receptor de Insulina (do inglês <i>Insulin Receptor Substrate-1</i> )
<b>kcal</b>	Quilocalorias
<b>kcal/g</b>	Quilocalorias por grama
<b>kDa</b>	Quilodaltons
<b>LDL.</b>	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>Low-Density Lipoprotein</i> )
<b>MC.</b>	Massa Corporal
<b>MES.</b>	Tecido adiposo mesentérico
<b>mg/dl</b>	Miligramas por decilitro
<b>MGC.</b>	Massa de Gordura Corporal
<b>ml</b>	Mililitro
<b>MLG.</b>	Massa Livre de Gordura
<b>NF-κB.</b>	Fator Nuclear kappa B (do inglês <i>Nuclear Factor kappaB</i> )
<b>ng/ml</b>	Nanograma por mililitro
<b>p38.</b>	Proteína quinase ativada por mitógenos
<b>PGC-1α.</b>	Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (do inglês <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator</i> )
<b>PPARγ.</b>	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (do inglês <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i> )
<b>RET.</b>	Tecido adiposo retroperitoneal
<b>Sed.</b>	Sedentário
<b>TAB.</b>	Tecido Adiposo Branco
<b>TAM.</b>	Tecido Adiposo Marrom
<b>TG.</b>	Triglicerídeos

<b>TNF-<math>\alpha</math>.</b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> )
<b>UCP-1.</b>	Proteína desacopladora 1 (do inglês <i>Uncoupling Protein 1</i> )
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidade máxima
<b>VLDL.</b>	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (do inglês <i>Very-Low Density Lipoproteins</i> )
<b>VO<sub>2máx</sub></b>	Consumo máximo de oxigênio



## **LISTA DE SIGLAS**

<b>ACSM</b>	<i>American College of Sports Medicine</i>
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>DEFMH</b>	Departamento de Educação Física e Motricidade Humana
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i> )
<b>UFSCar</b>	Universidade Federal de São Carlos

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	21
1.1	Obesidade .....	21
1.1.1	Tecido adiposo branco .....	22
1.1.2	Mecanismos de expansão do tecido adiposo .....	23
1.1.3	O tecido adiposo branco e as disfunções em outros órgãos.....	24
1.1.3.1	Fígado .....	25
1.1.3.2	Músculo esquelético .....	26
1.1.3.3	Tecido ósseo .....	27
1.1.3.4	Pâncreas .....	27
1.1.3.5	Tecido adiposo e inflamação .....	28
1.1.3.6	Fator de necrose tumoral alfa.....	29
1.1.3.7	Interleucina-1beta .....	30
1.1.3.8	Interleucina-10.....	30
1.1.3.9	Leptina .....	31
1.1.4	Tecido adiposo marrom .....	31
1.1.5	<i>Browning</i> do tecido adiposo .....	32
1.2	Irisina.....	35
1.2.1	Definição.....	35
1.2.2	Estrutura da irisina.....	35
1.2.3	Mecanismo de ativação da irisina.....	37
1.2.4	Atividades fisiológicas mediadas por FNDC5/Irisina .....	40
1.2.5	Irisina e obesidade .....	42
1.2.6	Irisina e glicose .....	43
1.2.7	Irisina e exercício.....	43
1.3	Estratégias para o controle da obesidade.....	44
1.3.1	Treinamento Físico .....	45
1.3.2	Intervenção dietética .....	47
1.3.3	Combinação de intervenção dietética e exercício .....	48
2	HIPÓTESES.....	51

3	OBJETIVOS.....	52
3.1	Objetivo geral .....	52
3.2	Objetivos específicos .....	52
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	53
4.1	Animais.....	53
4.2	Protocolos experimentais.....	53
4.2.1	Primeira intervenção- Indução da obesidade .....	53
4.2.2	Segunda intervenção- Treinamento e intervenção dietética .....	53
4.2.3	Composição das dietas.....	54
4.2.4	Desenho experimental.....	56
4.2.5	Adaptação ao treinamento e divisão dos grupos.....	57
4.2.6	Protocolo de teste máximo.....	58
4.2.7	Protocolo de treinamento .....	58
4.3	Perda amostral .....	60
4.4	Coleta dos tecidos.....	60
4.5	Controle de massa corporal e consumo alimentar .....	60
4.6	Composição corporal.....	60
4.7	Análises bioquímicas.....	61
4.7.1	Glicose e Insulina.....	61
4.7.2	Perfil lipídico .....	61
4.7.3	Análise bioquímica de irisina, leptina, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ e insulina.....	61
4.8	<i>Western Blotting</i> .....	62
4.9	Análise histológica .....	63
4.9.1	Análise das secções histológicas do fígado .....	64
4.9.2	Análise das secções histológicas dos adipócitos.....	65
4.10	Incorporação de lipídeos.....	66
4.11	Análise estatística .....	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	68
5.1	Indução da obesidade através da dieta hiperlipídica palatável .....	68
5.1.1	Evolução da massa corporal e consumo alimentar .....	68

5.1.2	Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a composição corporal, adiposidade e parâmetros metabólicos.....	69
5.1.3	Discussão .....	74
5.2	Efeitos do treinamento físico e da intervenção dietética em modelos animais induzidos a obesidade .....	86
5.2.1	Protocolo de teste máximo.....	86
5.2.2	Efeitos do treinamento físico e da intervenção dietética .....	86
5.2.3	Discussão .....	106
5.2.3.1	Efeitos do treinamento físico em modelos animais induzidos a obesidade .....	106
5.2.2.2.	Efeitos da intervenção dietética em modelos animais induzidos a obesidade.....	119
5.2.2.3.	Efeitos da combinação do treinamento físico e intervenção dietética dieta em modelos animais induzidos a obesidade .....	129
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	138
7	REFERÊNCIAS .....	140
8	ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA .....	165

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença progressiva manifestada por um acúmulo excessivo de gordura na forma de tecido adiposo, decorrente de um balanço energético positivo crônico (BLÜHER, 2019; JASTREBOFF et al., 2019). A etiologia da doença é multifatorial, incluindo alterações genéticas, psicológicas, econômicas, ambientais, sociais e fisiológicas (GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY, 2017). No entanto, o aumento no consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcares simples associados a redução do gasto energético constituem o principal propulsor da obesidade (ROMIEU et al., 2017).

Como consequência desse ambiente obesogênico ocorre um processo conhecido como “meta-inflamação” que representa um estado crônico de inflamação sistêmica de baixo grau, com a desregulação de mediadores da imunidade em tecidos que não são imunocompetentes (PESENTHEINER; DUCASA; GORDTS, 2020; URANGA; KELLER, 2019). A resposta imunomodulatória à obesidade abrange uma série de eventos que ativam a cascata inflamatória, tais como o estresse do retículo endoplasmático, disfunção mitocondrial e hipóxia que provocam o recrutamento persistente de macrófagos/monócitos e aumento na secreção de citocinas inflamatórias (LONGO et al., 2019). Esse processo está intimamente ligado ao desenvolvimento de patologias como diabetes *mellitus* tipo II (DM2), além da manifestação clínica de hipertensão arterial, hiperglicemia, e dislipidemia, os quais em conjunto caracterizam a síndrome metabólica (ANDERSEN; MURPHY; FERNANDEZ, 2016; LUMENG; SALTIEL, 2011). Esses distúrbios são significativamente influenciados pela distribuição anatômica do tecido adiposo (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; WAJCHENBERG, 2000).

Este pode ser classificado quanto a sua origem, morfologia, localização e função; em três tipos: tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marrom (TAM) e mais recentemente o tecido adiposo bege (UNAMUNO; FRÜHBECK; CATALÁN, 2019).

### 1.1.1 Tecido adiposo branco

O TAB possui adipócitos com um núcleo periférico e um citoplasma contendo uma única gota lipídica de triglicerídeos, que ocupa 90% do volume celular (GÓMEZ-HERNÁNDEZ et al., 2016; UNAMUNO; FRÜHBECK; CATALÁN, 2019). Além das células específicas, o TAB é composto por populações de células não adipocitárias, incluindo células endoteliais, estromais, macrófagos e precursoras de adipócitos (WRONSKA; KMIEC, 2012). Os adipócitos brancos tem como função primordial o armazenamento de energia, além da regulação da homeostase energética e controle endócrino (WAYNE et al., 2020). Por esse motivo, o tecido ainda apresenta um número menor de mitocôndrias e redução na expressão de enzimas relacionadas à oxidação de ácidos graxos, especialmente acil-CoA desidrogenase o que mostra menor função oxidativa do TAB em relação ao TAM. Ademais, seletas proteínas que apoiam a função lipogênica e degradam xenobióticos também são exclusivamente expressas no TAB (LEE et al., 2019).

Em relação a localização anatômica, o TAB é subdividido em dois compartimentos: tecido adiposo subcutâneo e o visceral. Histologicamente, o tecido adiposo subcutâneo é composto especialmente por adipócitos uniloculares intercalados com pequenos adipócitos multiloculares, enquanto o tecido adiposo visceral é composto em sua maioria por grandes adipócitos uniloculares (BERRY et al., 2013). Secretam mais citocinas anti-inflamatórias e têm maior sensibilidade à ação da insulina (LUONG; LEE, 2018). Uma vez que a capacidade de armazenamento dos adipócitos subcutâneos, é excedida, devido ao elevado aporte calórico, ocorre o acúmulo de gordura ectópica tanto em tecidos não-adiposos bem como nos adipócitos viscerais (LONGO et al., 2019). Por outro lado, os adipócitos viscerais têm elevada densidade mitocondrial e função bioenergética oxidativa (DEVEAUD et al., 2004; KRAUNSØE et al., 2010), possuem maior atividade lipolítica induzida por catecolaminas, são mais resistente à ação da insulina (WAJCHENBERG, 2000), e secretam mais citocinas inflamatórias em comparação ao tecido adiposo subcutâneo (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). Dessa forma, a expansão do tecido adiposo visceral tem sido diretamente associada à dislipidemias (WAJCHENBERG, 2000), resistência insulínica e DM2 (LONGO et al., 2019; SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018), e doenças cardiovasculares (NEELAND et al., 2019; WAJCHENBERG, 2000).

Em mamíferos o tecido adiposo visceral ainda é composto por diferentes depósitos: mesentéricos (MES), retroperitoneal (RET), perirrenais e perigonadal (epididimal (EPI) em

machos) (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). A heterogeneidade dentre os depósitos viscerais tem um forte impacto no metabolismo mitocondrial e lipídico e, nas respostas fisiológicas e patológicas associadas a obesidade (DEVEAUD et al., 2004). Em roedores, o EPI é o principal depósito de gordura (CHUSYD et al., 2016; VAN BEEK et al., 2015), diferente do que ocorre em humanos que estocam gordura no tecido adiposo omental (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). Embora o MES de animais, compartilhe mais similaridades com depósitos viscerais humanos (CHUSYD et al., 2016), o EPI também favorece o aparecimento de distúrbios metabólicos em ratos (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). Já foi observado que a gordura oriunda do EPI provoca a morte de adipócitos e recrutamento de macrófagos, além de deposição ectópica em fígado e desenvolvimento de resistência insulínica (VAN BEEK et al., 2015). Os adipócitos EPI ainda atingem o limite de expansão de forma mais precoce, além de secretar fatores inflamatórios previamente aos depósitos mesentéricos e subcutâneos (STRISSEL et al., 2007; VAN BEEK et al., 2015). Por outro lado, o RET expressa mais genes relacionados à lipólise, como lipase hormônio sensível (HSL) e da lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) do que o tecido adiposo inguinal e MES (WRONSKA; KMIEC, 2012). Ainda um estudo comparativo mostrou que os adipócitos RET expressam grandes quantidades dos fatores de transcrição lipogênica, como o receptor  $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR $\gamma$ ) e o fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (Srebp1c) em comparação com MES e adipócitos subcutâneos. Já os adipócitos MES mostram uma alta expressão de genes relacionados à lipogênese e uma baixa expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos (BJØRNDAL et al., 2011). Dados ainda mostraram que existe um aumento na sensibilidade dos adipócitos MES à lipólise, mediada por interleucina-6 (IL-6), quando comparados a adipócitos EPI, promovendo uma ligeira elevação na secreção de ácidos graxos livres (WUEEST et al., 2016).

### **1.1.2 Mecanismos de expansão do tecido adiposo**

Frente a exposição crônica de excesso de energia, o aumento da massa de tecido adiposo pode ocorrer de duas maneiras: através da diferenciação de precursores de tecidos residentes para a formação de novos adipócitos (hiperplasia) ou através da expansão de adipócitos existentes (hipertrofia) (RUTKOWSKI; STERN; SCHERER, 2015). Inicialmente, acredita-se que o processo de aumento dos adipócitos na fase adulta ocorre predominantemente através da hipertrofia (JO et al., 2009; JO; SHREIF; PERIWAL, 2012; LONGO et al., 2019). Após o armazenamento lipídico

exceder a capacidade dos adipócitos existentes (o tamanho do adipócito varia de 25 a 200  $\mu\text{m}$ ), se inicia um processo de sinalização intracelular, que consiste: na secreção de citocinas inflamatórias, na infiltração de macrófagos e monócitos, e no recrutamento de células pré-adipocitárias (hiperplasia) (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; JO et al., 2009; LUO; LIU, 2016).

A hiperplasia do tecido adiposo é geralmente considerada um mecanismo adaptativo às consequências geradas pela hipertrofia e está associada a saúde metabólica (LONGO et al., 2019; WHITE; RAVUSSIN, 2019). Isso, porque acredita-se que adipócitos hiperplásicos são capazes de manter a vascularização adequada, expressar citocinas anti-inflamatórias, como leptina e adiponectina e têm preservada a sensibilidade à ação da insulina (CHOE et al., 2016; GHABEN; SCHERER, 2019). Esses dados têm sugerido que a diferenciação de pequenos adipócitos poderia melhorar a resistência insulínica na obesidade, fornecendo capacidade adicional para armazenar o excesso de energia (CHOE et al., 2016). Dentre os fatores que regulam a diferenciação adipocitária, o PPAR $\gamma$ , é abundantemente expresso no TAB e representam um regulador chave na indução da adipogênese (AHMADIAN et al., 2013; ROSEN et al., 2002).

Por outro lado a hipertrofia de adipócitos é positivamente correlacionada com dislipidemia, aumento da resistência à insulina, hipóxia e inflamação (GASPAR; VELLOSO, 2018; LANDGRAF et al., 2015; MUIR et al., 2016; RYDÉN et al., 2014; VEILLEUX et al., 2011). A hipóxia gerada nas células adiposas induz a expressão de genes pró-fibróticos como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e o fator 1 induzível pela hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) levando à fibrose do tecido e à infiltração de células do sistema imune (GASPAR; VELLOSO, 2018; RUTKOWSKI; STERN; SCHERER, 2015). Ademais, em adipócitos hipertróficos a lipólise basal é elevada aumentando a secreção de ácidos graxos livres que pode causar um acúmulo lipídico ectópico (CHOE et al., 2016; WUEEST et al., 2009).

### **1.1.3 O tecido adiposo branco e as disfunções em outros órgãos**

A expansão do TAB leva a alterações metabólicas e inflamatórias no fígado, músculos estriados, esqueleto, pâncreas e o próprio tecido adiposo, além de outros órgãos (NEELAND et al., 2019).



### 1.1.3.1 Fígado

As alterações advindas da obesidade podem levar a desregulação do metabolismo das lipoproteínas (FRANSSEN et al., 2011). De maneira geral, em indivíduos obesos, são observados níveis aumentados de TG, diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL), e uma alteração nas moléculas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para uma composição mais pró-aterogênica, a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (GRUNDY, 2004; KLOP; ELTE; CABEZAS, 2013). No tecido hepático, os ácidos graxos livres são transportados pela veia portal e artéria hepática até o fígado. Em condições de excesso, a captação de ácidos graxos livres e consequente esterificação em TG intra-hepático se torna superior a oxidação e secreção de ácidos graxos para circulação (FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010). Simultaneamente, ocorre um aumento na síntese hepática de VLDL, que embora promova a retirada de TG intra-hepático para circulação, não supera a síntese de TG resultante do excesso de ácidos graxos livres. Em conjunto, esses processos levam a um aumento de ácidos graxos hepáticos esterificados em TG, LDL e HDL (FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010; HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; WAJCHENBERG, 2000). Essa deposição ectópica de lipídeos no fígado ainda pode causar o aumento na expressão de citocinas inflamatórias, que levam à fibrogênese hepática inflamação e resistência insulínica (NIEDERREITER; TILG, 2018).

Além de participar do metabolismo lipídico, o fígado ainda regula o metabolismo da glicose. Dessa forma, inúmeras pesquisas investigaram a associação entre dieta hiperlipídica e resistência insulínica. Foi demonstrado que em indivíduos obesos, existe comumente a presença da resistência à ação da insulina, porém se essa alteração existe como causa ou consequência da obesidade, ainda não está bem definido (GRUBEN et al., 2014; MATSUZAKA; SHIMANO, 2011; SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007). Sabe-se que os ácidos graxos livres ativam receptores *toll-like* (TLR) que por sua vez ativam o complexo de proteína quinase Ikk- $\beta$  (inibidor da subunidade beta do fator nuclear kappa- $\beta$ ) e inibem a ação do substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), interferindo diretamente na sinalização insulínica, contribuindo para o desenvolvimento da resistência insulínica (GRUBEN et al., 2014). Ademais, a inflamação gerada pela deposição ectópica de lipídeos, aumenta a expressão das citocinas inflamatórias, como IL-6, interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e que também estão envolvidas com a resistência insulínica (SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007). Por outro lado, a manifestação

inicial da resistência insulínica pode levar a esteatose hepática por estimular a lipogênese, promovendo o aumento de triglicerídeos e ácidos graxos livres intra-hepático e posteriormente na circulação sanguínea, causando conseqüente reabsorção pelo tecido adiposo e fígado, gerando um ciclo vicioso (GRUBEN et al., 2014; MATSUZAKA; SHIMANO, 2011).

### **1.1.3.2 Músculo esquelético**

Similar ao que ocorre no fígado, a obesidade leva ao aumento do fluxo de ácidos graxos livres circulantes e maior captação pelo músculo esquelético (TUMOVA; ANDEL; TRNKA, 2016). Esse processo promove o acúmulo de TG intramuscular e subfascicular o que gera uma sobrecarga da  $\beta$ -oxidação mitocondrial (DI MEO; IOSSA; VENDITTI, 2017; EBBERT; JENSEN, 2013; MORO; BAJPEYI; SMITH, 2008). O acúmulo de ácidos graxos livres produz metabólitos como diacilglicerol, ceramida que estão fortemente associados ao desenvolvimento de resistência insulínica, por prejudicar a sinalização da insulina, ao ativar as isoformas proteína quinase C atípica que inibem o IRS-1 (DI MEO; IOSSA; VENDITTI, 2017; MORO; BAJPEYI; SMITH, 2008).

Adicionalmente, o músculo, assim como o tecido adiposo é um grande secretor de fatores hormonais. No entanto, enquanto a maioria das adipocinas pró-inflamatórias são reguladas pela obesidade, a maioria das miocinas é regulada principalmente pelo exercício a fim de atenuar os efeitos prejudiciais das adipocinas (WU; BALLANTYNE, 2017). Em indivíduos obesos o aumento da peroxidação de triglicerídeos intramusculares pode induzir a expressão especialmente de TNF- $\alpha$  no músculo, proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), além de infiltração de macrófagos e monócitos e demais citocinas de forma sistêmica (MORO; BAJPEYI; SMITH, 2008; WU; BALLANTYNE, 2017). Esses fatores via ativação Ikk/NF-kB podem promover a fosforilação em serina do IRS-1, prejudicando o metabolismo da glicose (DI MEO; IOSSA; VENDITTI, 2017; MORO; BAJPEYI; SMITH, 2008; WU; BALLANTYNE, 2017).

Dentre os demais efeitos, a obesidade ainda pode afetar a resistência, a fadiga, a força muscular, e a potência ao alterar o tipo de fibra muscular resultante e a sinalização do cálcio para função contrátil. Na obesidade ocorre a supressão da atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que promove a inibição do fator potenciador de miócitos 2 (MEF2) mediada pela histona deacetilase (HDAC) de classe II (TALLIS; JAMES; SEEBACHER, 2018). Como

resultado, há uma mudança dos tipos de fibra muscular lenta para rápida. Nesse contexto, é importante destacar que fibras musculares de contração lenta possuem alta capacidade oxidativa e melhor sensibilidade à ação da insulina, bem como melhor captação de glicose via transportador de glicose (GLUT-4) (ACEVEDO et al., 2017). Ainda, a diminuição da massa muscular observada em obesos, pode alterar a capacidade de locomoção, induzindo a níveis reduzidos de mobilidade e consumo de energia, favorecendo o aumento da massa e gordura corporal (TALLIS; JAMES; SEEBACHER, 2018). Embora indivíduos obesos tenham mais força muscular máxima devido à sobrecarga mecânica imposta em membros inferiores, quando normalizada a variável massa de gordura e corporal, indivíduos obesos possuem menos força em relação a eutróficos (TALLIS; JAMES; SEEBACHER, 2018).

### **1.1.3.3 Tecido ósseo**

Uma interação complexa entre tecido ósseo e adiposo tem sido descrita na literatura. O efeito clássico da obesidade na modelação óssea, sugere a obesidade como protetora da osteoporose. Semelhante ao mecanismo muscular, a obesidade promove um estímulo derivado da sobrecarga mecânica que são captados por sensores das células ósseas, levando à inibição dos osteoclastos. Concomitantemente, ocorre a liberação de fatores químicos estimuladores da proliferação de osteoblastos favorecendo a remodelação óssea que gera o aumento na densidade mineral óssea (DMO) (CAO, 2011). Porém essa clássica visão do efeito protetivo da obesidade no metabolismo ósseo resultou em diversos questionamentos (ARMAMENTO-VILLAREAL et al., 2014). Pesquisas recentes propõem que o acúmulo de adipócitos na medula óssea aumenta as citocinas pró-inflamatórias oriundas do tecido adiposo, como MCP-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  resultando na diminuição da DMO afetando a via de receptores do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL/RANK/OPG). Esses fatores específicos potencializam a ação osteoclástica, ao inibir a apoptose de osteoclastos e suprimir a osteoblastogênese, o que leva a uma maior reabsorção óssea e consequente redução da DMO (FAIENZA et al., 2019; SAVVIDIS; TOURNIS; DEDE, 2018).

### **1.1.3.4 Pâncreas**

Recentemente, o termo doença do pâncreas gorduroso não alcoólico, tem sido utilizado na literatura para descrever a esteatose pancreática em associação à obesidade e à síndrome metabólica (SAKAI; TAYLOR; CHOUHAN, 2018; SMITS; VAN GEENEN, 2011). No pâncreas,

é proposto que a deposição ectópica, ocorra em semelhantes mecanismos que os órgãos supracitados: o acúmulo de lipídeos causa um estresse oxidativo sobre o retículo endoplasmático das células do tecido pancreático; além disso as adipocinas resultantes da deposição ectópica promovem uma inflamação localizada. Adipocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, e IL-1 $\beta$  podem levar a à disfunção de células  $\beta$  e promover a apoptose ao ativar o fator de transcrição do NF- $\kappa$ B, aumentando posteriormente as chances no desenvolvimento de DM2 (SAKAI; TAYLOR; CHOUHAN, 2018). Ainda, a falha das células  $\beta$  reduz a detecção do aumento de glicose, aumentando a secreção de insulina basal e, portanto, a hiperglicemia é manifestada (ALARCON et al., 2016; CERF, 2013; ELHADY et al., 2019).

#### **1.1.3.5 Tecido adiposo e inflamação**

A visão clássica do tecido adiposo como um reservatório energético foi retratada em 1987, quando o tecido foi identificado como um importante local para o metabolismo de esteroides sexuais e, consolidada em 1994 como um órgão endócrino, após identificada a secreção de leptina (FLIER et al., 1987; ZHANG et al., 1994). Desde então, diversos fatores secretados pelo tecido adiposo tem sido estudados, especialmente porque dentre esses, existem proteínas que elevam a produção e circulação de fatores relacionados com a inflamação (DO PRADO et al., 2009).

Os estímulos precisos da inflamação associada à obesidade ainda não estão claros (SALTIEL; OLEFSKY, 2017), mas sabe-se que a expansão do tecido adiposo, que ocorre especialmente através da hipertrofia, causa uma disfunção que leva a hipóxia (GASPAR; VELLOSO, 2018; LANDGRAF et al., 2015; MUIR et al., 2016; RYDÉN et al., 2014; VEILLEUX et al., 2011). A hipótese proposta por Cinti et al. (2005) é de que a necrose de adipócitos induzidos pela hipertrofia, sejam um estímulo fagocítico inicial que regula a infiltração de macrófagos (CINTI et al., 2005). Recentemente, ainda foi demonstrado que o aumento constante do tecido adiposo promove um estresse da matriz extracelular, com contínua produção e deposição de seus componentes, resultando no processo de fibrose e que pode estar associado ao quadro de hipóxia (PESENTHEINER; DUCASA; GORDTS, 2020). Como resultado da hipóxia, sinalizações intracelulares promovem o recrutamento de macrófagos, que se agregam, formando estruturas semelhantes a coroas ao redor de adipócitos necróticos para fagocitar a gotícula lipídica. Dessa forma, ocorre a polarização de macrófagos M2 para um fenótipo M1 pró-inflamatório, que se

relaciona de forma positiva com a resistência insulínica e com o espectro inflamatório da obesidade (CHOE et al., 2016; LUMENG; SALTIEL, 2011; MCARDLE et al., 2013).

Dentre esses, já foi observado que em indivíduos obesos, os macrófagos representam 50% da população de células nos depósitos de gordura em obesos, em oposição aos 10% observados em indivíduos magros (WEISBERG et al., 2003). Além das citocinas secretadas por adipócitos, os macrófagos M1 também secretam citocinas inflamatórias, contribuindo para a inflamação crônica na obesidade (UNAMUNO; FRÜHBECK; CATALÁN, 2019). No entanto, se a contribuição da secreção de adipocinas é, na sua maioria, vinda de adipócitos ou macrófagos infiltrados, ainda precisa de mais esclarecimentos (FAIN et al., 2004).

De forma geral, o tecido adiposo é o maior contribuinte da secreção de citocinas inflamatórias e não inflamatórias durante o desenvolvimento da obesidade através da secreção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , interleucina-10 (IL-10), monócitos e macrófagos (CHOE et al., 2016; HOTAMISLIGIL et al., 1995; LUMENG; SALTIEL, 2011; MCARDLE et al., 2013).

#### **1.1.3.6 Fator de necrose tumoral alfa**

O TNF- $\alpha$  é uma adipocina que induz a apoptose, e inibe a ação da lipogênese. A concentração e o número de receptores de indivíduos obesos podem estar elevados em 2,5 vezes, quando comparados a indivíduos eutróficos (WAJCHENBERG, 2000). Esses níveis de TNF- $\alpha$  em obesos estão relacionados ao aumento da secreção de leptina, IL-6, proteína-C reativa e inibidor de plasminogênio ativado-1, bem como a supressão da adiponectina e do GLUT-4 no tecido adiposo (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004). O TNF- $\alpha$  interfere na sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação do IRS-1 e a atividade do receptor insulina quinase (PI3K), o que resulta em redução de síntese e translocação do GLUT-4 para a membrana celular e consequente diminuição na captação de glicose pelas células (ALZAMIL, 2020; STEPHENS; LEE; PILCH, 1997). Ainda no fígado, o TNF- $\alpha$  favorece a ação lipogênica ao suprimir a atividade de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e aumentar a expressão de genes envolvidos na síntese de colesterol e ácidos graxos e na produção de VLDL (CAWTHORN; SETHI, 2008).

### 1.1.3.7 Interleucina-1beta

A IL-1 $\beta$  é um fator imunomodulador, produzido em grande parte por macrófagos e em reduzida escala por adipócitos. Está envolvida na disfunção e apoptose das células  $\beta$  e na etiologia da resistência insulínica e DM2 (FEBBRAIO, 2014; MAEDLER et al., 2002; SPEAKER; FLESHNER, 2012). Estudos mostraram que indivíduos obesos manifestam níveis mais elevados de IL-1 $\beta$  (FAIN, 2006; KOENEN et al., 2011; PALOMERA et al., 2018; SHODA et al., 2017). Em altas concentrações, a IL-1 $\beta$  inibe a adipogênese e diminui a expressão proteica do IRS-1 e GLUT4 em adipócitos 3T3-L1 de roedores, contribuindo para o desenvolvimento da resistência insulínica (BING, 2015; HORNG; HOTAMISLIGIL, 2011; JIANG et al., 2019). Outros dados confirmaram esses achados, mostrando que o bloqueio de IL-1 $\beta$  reduziu a inflamação do tecido adiposo e melhorou a sensibilidade à insulina dos tecidos (CAVELTI-WEDER et al., 2012; LARSEN et al., 2007; SLOAN-LANCASTER et al., 2013). Ademais a IL-1 $\beta$  age diretamente na regulação da função das células  $\beta$  e promove a apoptose ao ativar o fator de transcrição do NF- $\kappa$ B levando a hiperglicemia (MAEDLER et al., 2002).

### 1.1.3.8 Interleucina-10

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 através da ativação do receptor solúvel de TNF- $\alpha$  e do antagonista do receptor IL-1R (FEBBRAIO, 2014). A obesidade está associada a níveis circulantes elevados de IL-10 no tecido adiposo de humanos e roedores, provavelmente por um mecanismo compensatório (FEBBRAIO, 2014; TAM et al., 2010). Como uma citocina anti-inflamatória, a IL-10 demonstrou ter um papel protetor na formação e na estabilidade de lesão aterosclerótica, impedindo o ganho de peso, aumentando a tolerância à glicose pelos tecidos e atenuando a infiltração de macrófagos no tecido adiposo (FEBBRAIO, 2014; JUGE-AUBRY et al., 2005). Por outro lado, seus níveis já estiveram reduzidos em obesos mórbidos (KONDO et al., 2018; LEON-CABRERA et al., 2015). Ademais, a deficiência de IL-10 não potencializou a inflamação do tecido adiposo ou a resistência à insulina, sugerindo um papel não protetor na obesidade (STOLARCZYK, 2017).

### 1.1.3.9 Leptina

A leptina foi a primeira adipocina, descoberta em 1994, secretada predominantemente pelo tecido adiposo e tem como função primordial a regulação da homeostase energética (ZHANG et al., 1994). A trajetória evolutiva considera que o principal papel fisiológico da leptina é responder de forma defensiva ao aumento de gordura corporal que pode prejudicar a sobrevivência e a aptidão reprodutiva (MYERS et al., 2010). Dessa forma, a leptina é secretada em resposta ao aumento do consumo alimentar e adiposidade, inibindo o apetite, através da estimulação de neurônios da pró-opiomelanocortina (POMC) e inibindo neurônios AgRP/NPY (AgRP: peptídeo relacionado ao gene *agouti*; NPY: neuropeptídeo Y) (CHOE et al., 2016).

Dados anteriores evidenciaram que em elevadas concentrações a adipocina estimula a oxidação lipídica e previne o acúmulo lipídico em tecidos não-adiposos, através da ativação da AMPK (MINOKOSHI et al., 2002), da ativação da função mitocondrial em tecidos musculares pela elevação de genes termogênicos e conseqüentemente aumento do gasto energético (HENRY et al., 2011), ainda tem papel fundamental na homeostase glicêmica, na imunidade e inflamação (PAZ-FILHO; MASTRONARDI; LICINIO, 2015). Dessa forma, inicialmente a leptina passou a ser vista como um potencial tratamento no controle da obesidade (PAZ-FILHO; MASTRONARDI; LICINIO, 2015). No entanto, posteriormente foi comprovado que em indivíduos obesos, a leptina está em concentrações mais elevadas quando comparadas as encontradas em indivíduos eutróficos, proporcional ao incremento na massa do tecido adiposo (CARO et al., 1996). Assim um acúmulo excessivo de leptina nesses indivíduos pode alterar a resposta central e reajustar o efeito inibitório sobre o apetite. Potenciais mecanismos subjacentes da resistência à leptina foram propostos, uma vez que mutações genéticas da leptina, não são frequentemente observadas. Os mecanismos incluem alterações na estrutura da molécula e no transporte, através da barreira hematoencefálica, além de alterações no receptor e na sinalização da leptina (GRUZDEVA et al., 2019; WOODS et al., 2000).

### 1.1.4 Tecido adiposo marrom

Os adipócitos marrons são células poligonais com ~50% do volume ocupado por lipídeos multiloculares, maior número de mitocôndrias, altamente inervado e contém elevada quantidade de proteína desacopladora 1 (UCP-1) (CANNON; HOUSTEK; NEDERGAARD, 1998;

CANNON; NEDERGAARD, 2004; GIORDANO; FRONTINI; CINTI, 2016). Ao contrário do TAB que é rapidamente infiltrado por células inflamatórias em resposta à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, o TAM parece não acumular esse infiltrado de macrófagos e secreta de 10 a 100 vezes menos fatores inflamatórios (DOWAL et al., 2017). Ademais, os macrófagos do TAM não têm o mesmo perfil de expressão de citocinas e quimiocinas que os do TAB, atenuando o processo de inflamação mediada por esse tecido (DOWAL et al., 2017). A atividade do TAM pode ser aumentada com a exposição ao frio e estimulação noradrenérgica, uma vez que esse tecido é densamente innervado por fibras noradrenérgicas (GIORDANO; FRONTINI; CINTI, 2016). Dessa forma, a UCP-1 quando ativada facilita a movimentação de prótons através da membrana interna mitocondrial contra o gradiente de concentração, levando a dissipar energia pela respiração mitocondrial na forma de calor (HERZ; KIEFER, 2019). Já foi observado em roedores que o TAM, quando totalmente ativado, pode elevar o gasto energético em até 60% acima da taxa metabólica basal (FOSTER; FRYDMAN, 1978).

Nesse sentido, controlar a expansão do TAB e ativar o TAM tem sido potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da obesidade (KURYŁOWICZ; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, 2020). Em particular, aproveitar o potencial da termogênese mediada pelo TAM tornou-se uma estratégia atraente para combater a obesidade (CALDERON-DOMINGUEZ et al., 2016). Estudos que investigam a indução do fenótipo de gordura marrom em TAB na prevenção e tratamento a obesidade, mostram que ainda existe uma lacuna sobre os depósitos anatômicos e o escurecimento do TAB humano. Portanto, pesquisas recentes se debruçam a identificar fatores que atuam na reprogramação e sinalização de adipócitos brancos em beges (HERZ; KIEFER, 2019).

### **1.1.5 *Browning* do tecido adiposo**

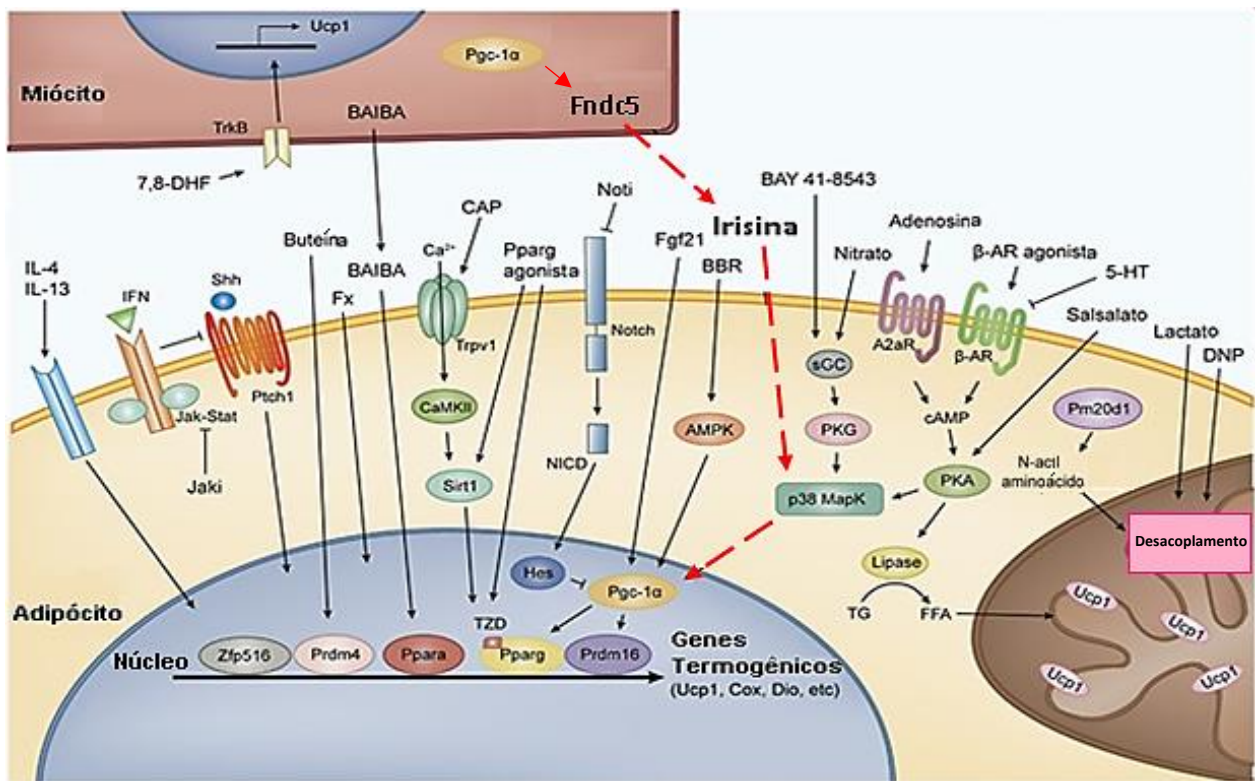
O processo de *browning* se refere ao escurecimento do tecido adiposo branco e, é caracterizado pela conversão de adipócitos brancos em adipócitos beges ou adipócitos que adquirem características semelhantes a adipócitos marrons. Esse fenômeno promove o aparecimento de adipócitos multiloculares, com maior número de mitocôndrias e que expressam UCP-1 em depósitos de TAB (COUSIN et al., 1992; LONČAR, 1991; YOUNG; ARCH; ASHWELL, 1984). Esses adipócitos são considerados um tipo recrutável e induzível de célula adiposa marrom que não compartilha a mesma origem genética do TAM clássico. Acredita-se que os adipócitos beges possam ser provenientes da transdiferenciação de adipócitos brancos,



especialmente inguinais, ou derivados da proliferação e/ou diferenciação de células precursoras (CANNON et al., 2020; GIORDANO; FRONTINI; CINTI, 2016; WU; COHEN; SPIELGEMAN, 2013). Dessa forma, após exposição ao frio, estímulos noradrenérgicos e outros estímulos endócrinos, as células do TAB ou precursoras adquirem semelhante funcionalidade a adipócitos do TAM, compartilham a mesma morfologia e expressam semelhantes genes termogênicos (HARMS; SEALE, 2013; PETROVIC et al., 2010). Isso confere maior sensibilidade à ação da insulina e promove maior gasto energético (BOSTRÖM et al., 2012; WU; COHEN; SPIELGEMAN, 2013). Essa propriedade induzida conferida ao tecido é importante no desenvolvimento de terapias que se debruçam a elevar a função do TAM em indivíduos obesos.

Diversas moléculas estão envolvidas no processo de escurecimento da gordura (Figura 1), dentre essas moléculas termogênicas naturais (berberina, buteína, 7,8- DHF), componentes sintéticos (agonistas de  $P\text{par}\gamma$  e  $\beta 3$ -AR, inibidor de Jak e Notch, salsalato, BAY 41-8543) e compostos endógenos (lactato, nitrato e adenosina) (SONG et al., 2017). Além da regulação de proteínas transcricionais clássicas que induzem a termogênese, novos elementos têm sido alvo da investigação pelo potencial terapêutico, especialmente a irisina tem sido destacada por mediar efeitos sistêmicos no organismo (BOSTRÖM et al., 2012).

**Figura 1 - Mecanismo molecular de indução termogênica e cascatas de sinalização celular nos adipócitos**



O percurso da irisina/FNDC5 é destacado em vermelho. A irisina, quando secretada por células musculares durante o exercício pode agir sobre os adipócitos brancos e estimular a termogênese. Outras moléculas ainda possuem propriedades termogênicas, como compostos naturais (berberina, buteína, 7,8- DHF), componentes sintéticos (agonistas de Pparγ e β-AR, inibidor de Jak e Notch, salsalato, BAY 41–8543) e compostos endógenos (lactato, nitrato e adenosina). A2aR: receptor de adenosina A2a; AMPK: proteína quinase ativada por AMP; β-AR: receptor β-adrenérgico; BAIBA: ácido β-aminoisobutírico; BBR: berberina; CaMKII: proteína quinase II dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina; CAP: capsaicina; 7,8 DHF: 7,8 dihidroxiflavona; DNP: dinitrofenol; Fx: fucoxantina; Hes: cabeludo e potenciador de divisão; IFN: interferon; Jaki: inibidor de Jak; p38 MAPK: proteína quinase ativada por mitogênio p38; Pgc-1α: coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma; PPAR: receptor ativado por proliferador de peroxissoma; PKA: proteína quinase A; PKG: proteína quinase G; Pm20d: peptidase M20 contendo o domínio 1; Ppar: receptor ativado por proliferador de peroxissoma; Prdm: proteínas contendo o domínio PR; Pth1: Patched-1; sGC, guanilato ciclase solúvel; Shh, ouriço Sônico; Sirt1, Sirtuína 1; TrkB, receptor B de quinase relacionado à tropomiosina; Trpv1: receptor transitório potencial canal catiônico subfamília V membro 1; TZD: tiazolidinediona; Ucp1: proteína desacopladora 1; Zfp516: proteína de dedo de zinco 516; Noti: inibidor Notch. Fonte: Adaptado de Song et al. (2017).

A irisina secretada por células musculares durante o exercício pode agir sobre os adipócitos brancos e estimular a termogênese. Por esse fato tem sido proposta como uma potencial ferramenta para o controle de doenças como obesidade e comorbidades (BOSTRÖM et al., 2012; MORENO-NAVARRETE et al., 2013).

## **1.2 Irisina**

### **1.2.1 Definição**

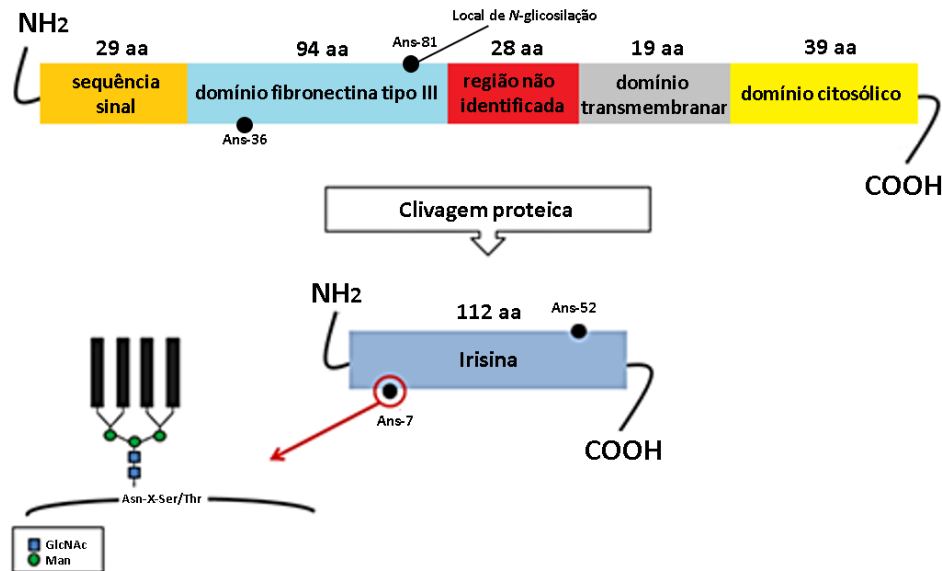
O músculo é um órgão endócrino que atua em funções fisiológicas imprescindíveis ao organismo, como na regulação da termogênese e metabolismo energético. Para atender a essa demanda o músculo esquelético secreta citocinas denominadas miocinas (SCHNYDER; HANDSCHIN, 2015). Essas proteínas são resultantes da contração muscular, promovem efeitos parácrinos ou autócrinos no organismo, atuam na regulação do metabolismo energético e possibilitam a comunicação entre o músculo e outros órgãos, como o tecido adiposo, osso, pâncreas, o fígado e o cérebro (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). No entanto, até pouco tempo atrás ainda era desconhecido de que forma uma proteína dependente do músculo poderia mediar efeitos sistêmicos no metabolismo.

Dessa forma, em 2012, a irisina foi caracterizada como uma miocina, dependente de coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 $\alpha$ ) que promove a transdiferenciação de adipócitos do TAB a beges e estimula a termogênese, aumenta a captação de glicose pelo músculo esquelético, inibe a diferenciação adipogênica e atua de forma positiva no metabolismo de lipídeos (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019; BOSTRÖM et al., 2012).

### **1.2.2 Estrutura da irisina**

A irisina é um fragmento de uma proteína transmembranar chamada fibronectina tipo III- contendo domínio 5 (FNDC5/FRCP2/PeP) (Figura 2) (BOSTRÖM et al., 2012). O FNDC5 é composto por 209 aminoácidos residuais. Contém uma sequência N-terminal composta por 29 aminoácidos, fibronectina tipo III com 94 aminoácidos e uma região não identificada de 28 aminoácidos, o domínio transmembranar tem 19 aminoácidos, e uma região C-terminal de 39 aminoácidos (SCHUMACHER et al., 2013). O fragmento C-terminal do FNDC5 está localizado no citoplasma, enquanto a porção extracelular do N-terminal é clivada proteoliticamente para produzir irisina que é liberada na circulação (BOSTRÖM et al., 2012).

**Figura 2 - Estrutura do FNDC5/ Irisina.**



Representados com pontos pretos estão os potenciais locais de N-glicosilação. Asn: asparagina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Man: manose; Ser: serina; Thr: treonina. Fonte: Adaptado de Korta, Poche, Mazur-Biały (2019).

A protease que é responsável pela clivagem da molécula FNDC5 não foi identificada, mas acredita-se que após clivagem a proteína é acompanhada de modificação e secreção. Dados recentes sugerem que a glicosilação da molécula ligada ao N é necessária para a secreção de irisina e ocorre através de locais específicos (de Asn36 e Asn81) (Figura 2) (KORTA; POCHE; MAZUR-BIAŁY, 2019). A glicosilação contribui para a estabilização e funcionalidade da molécula, aumenta a meia-vida de 7 horas para 12 horas e resulta em aumento da secreção na corrente sanguínea (KORTA; POCHE; MAZUR-BIAŁY, 2019; NIE; LIU, 2017).

A irisina é composta por 112 aminoácidos e o peso molecular varia de 12 a 32 kDa, dependendo do número e estrutura dos oligossacarídeos (glicanos) ligados à molécula de proteína durante o processo pós-traducional de N-glicosilação e da dimerização da molécula (FATOUROS, 2018; JEDRYCHOWSKI et al., 2015). A deglicosilação da irisina reduz seu peso molecular para 12 kDa ou 15 kDa e a glicosilação aumenta sua massa para 22 kDa ou 25 kDa (KORTA; POCHE; MAZUR-BIAŁY, 2019). Os resultados foram confirmados através de espectrometria de massa por Jedrychowski et al. (2015) com amostras de plasma humano. Os N-glicanos parecem ter importante participação na atividade de escurecimento dos adipócitos (NIE; LIU, 2017; SCHUMACHER et

al., 2013). No entanto, a forma não glicosilada (12Kda) parece também exercer atividade biológica (PARK et al., 2015; PÉREZ-SOTELO et al., 2017; VAUGHAN et al., 2014; XIE et al., 2015).

### 1.2.3 Mecanismo de ativação da irisina

Fatores como frio (LEE et al., 2014), atividade física (BOSTRÖM et al., 2012), estado nutricional (ROCA-RIVADA et al., 2013) e as concentrações de leptina (GUTIERREZ-REPISO et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2015) já foram descritos na literatura por alterar o nível de FNDC5 no organismo. Dentre esses fatores o exercício é predominante na secreção de irisina e através dele, a via de ação da irisina foi elucidada.

Assim, o exercício físico induz a expressão do co-ativador PGC-1 $\alpha$  no músculo esquelético, devido ao aumento da demanda energética (RIUS-PÉREZ et al., 2020). A PGC-1 $\alpha$  é uma proteína coativadora que controla a biogênese mitocondrial e favorece a transcrição de diversos genes em resposta a estímulos (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019). Dentre os fatores estimulantes, exercícios de curta duração e aeróbico em modelos animais e humanos têm mostrado o aumento da expressão do PGC-1 $\alpha$  no músculo esquelético o que favorece a transcrição de genes envolvidos na termogênese adaptativa e biogênese mitocondrial (BOSTRÖM et al., 2012; LIANG; WARD, 2006). Dentre os genes sujeitos à coativação transcricional do PGC-1 $\alpha$ , o PPAR- $\gamma$  representa uma família de receptores nucleares essencial para a adipogênese e diferenciação. O PGC-1 $\alpha$  se liga ao PPAR- $\gamma$  e co-ativa o PPAR- $\gamma$  para estimular a transcrição de genes envolvidos no processo de diferenciação de adipócitos marrons (LIANG; WARD, 2006; PUIGSERVER et al., 1998).

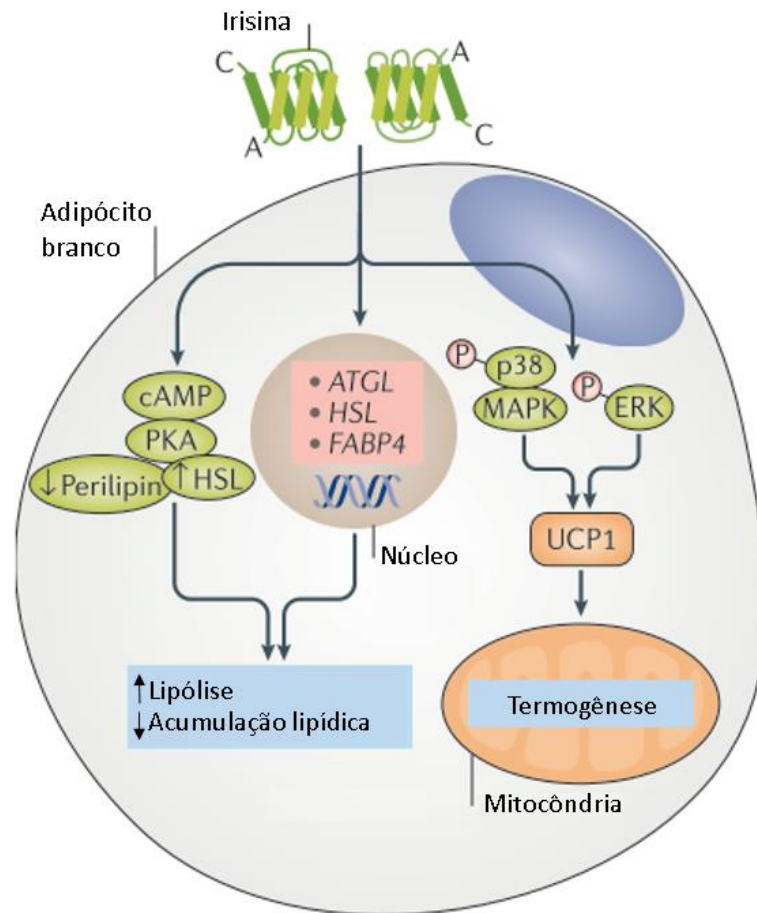
Após ser expressa em altas quantidades, a PGC-1 $\alpha$  induz a expressão da molécula FNDC5 em músculos que sofre uma clivagem (com remoção da sequência sinal) originando como subproduto a irisina, secretada na circulação sanguínea. Após ser secretado a irisina se liga a um receptor e promove ações parácrinas e autócrinas (BOSTRÖM et al., 2012).

Ainda não está totalmente esclarecido como funciona a sinalização do receptor da proteína FNDC5/irisina em todos os tecidos, mas dados recentes de Kim et al. (2018) usando culturas de células e modelos animais, mostraram que a irisina se liga às integrinas  $\alpha$ v/ $\beta$ 5, moléculas de adesão celular e que ativam o complexo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) das moléculas de

fibronectina extracelular (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019; KIM et al., 2018). Consequentemente a transdiferenciação de adipócitos parece ser o resultado da atenuação da sinalização  $\alpha V$  induzida pela irisina (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019). Ao se ligar ao receptor de adipócitos brancos, a irisina estimula a expressão de UCP-1 nos adipócitos, levando ao escurecimento de TAB através das vias da proteína quinase ativada por mitógenos p38 (MAPK) e das vias quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (ZHANG et al., 2014).

Com base nos dados obtidos, como mostrado na Figura 3, acredita-se que a irisina se liga a um receptor nos adipócitos, muito provavelmente às integrinas  $\alpha v/\beta 5$  que podem estimular a sinalização de p38 MAPK e ERK/MAPK (YEE; WEAVER; HAMMER, 2008). Portanto, através dessa via, a irisina induz a expressão do gene UCP-1 promovendo subsequentemente o escurecimento do TAB (BOSTRÖM et al., 2012).

**Figura 3 - O mecanismo proposto como ação da irisina em adipócitos.**



A irisina promove a transdiferenciação de adipócitos brancos ao induzir a expressão do gene UCP1 por meio sinalização de p38 MAPK e ERK/MAPK. A irisina também estimula a lipólise por meio do cAMP-PKA- perilipina-HSL e através da regulação positiva da expressão de ATGL, HSL e FABP4. p38/MAPK: proteína quinase ativada por mitogênio p38; ERK: sinal extracelular via da quinase regulada; cAMP: AMP cíclico; PKA: proteína quinase A; HSL: lipase hormônio sensível; FABP4: proteína de ligação de ácido graxo; UCP1: proteína desacopladora 1; ATGL: lipase de triacilglicerol do adipócito. Fonte: Adaptado de Perakakis et al. (2017).

Ainda, a irisina regula o metabolismo de lipídeos (Figura 3) pois promove a lipólise e reduz a acumulação lipídica por meio da via AMP cíclico (cAMP)-proteína quinase A (PKA)-perilipina-HSL e através da regulação positiva da expressão de ATGL, HSL e FABP4 (proteína de ligação de ácido graxo) (GAO et al., 2016; PERAKAKIS et al., 2017).

#### 1.2.4 Atividades fisiológicas mediadas por FNDC5/Irisina

No estudo inicial Boström et al. (2012) evidenciaram que a superexpressão de *Fndc5* em adipócitos primários inguinais na concentração de 20nM aumentou em 7 vezes a expressão de UCP-1 e regulou de forma positiva os principais genes termogênicos. Ademais, as células tratadas com *Fndc5*-recombinante apresentaram uma densidade elevada de mitocôndrias e aumento de 100% no consumo de oxigênio. Dada a relevância da descoberta do FNDC5/irisina, as pesquisas se dedicaram a avaliar o papel preciso na homeostase energética. Estudos subsequentes ofereceram um novo paradigma ao caracterizar a proteína como uma adipocina secretada pelo TAB e em menor grau, pelo TAM.

A proteína FNDC5/irisina secretada por adipócitos é modulada de maneira dependente da localização anatômica do tecido adiposo e o estado nutricional (ROCA-RIVADA et al., 2013). Além do tecido adiposo e muscular, a irisina, em quantidades menores também é produzidas pelos testículos, fígado, pâncreas, cérebro, baço, coração e estômago (KORTA; POCHE; MAZUR-BIALY, 2019). Em humanos, a expressão de FNDC5 mostrou-se 100 a 200 vezes maior pelos músculos, indicando uma menor contribuição do tecido adiposo (LOPEZ-LEGARREA et al., 2014; PERAKAKIS et al., 2017). Os dados foram reforçados em modelos animais, que mostraram que o músculo representa a principal fonte de secreção, correspondendo a ~ 72% dos níveis circulantes totais da proteína (ROCA-RIVADA et al., 2013). As fibras lentas (sólido) secretam aproximadamente 40% mais FNDC5/irisina do que o músculo glicolítico rápido (gastrocnêmio), 20% mais do que tecido adiposo subcutâneo e 60% mais do que o tecido adiposo visceral aproximadamente (ROCA-RIVADA et al., 2013). Já em humanos obesos, o FNDC5 foi expresso de forma igualitária na gordura visceral, subcutânea e epigástrica (GERHARD et al., 2014).

Seja a liberação através do tecido muscular, adiposo ou outros tecidos, a irisina quando liberada na circulação possui funções de múltiplos espectros: (i) inibe a diferenciação adipogênica enquanto promove a diferenciação osteogênica; (ii) influencia a função do músculo esquelético, pâncreas, fígado, cérebro e osso; (iii) aumenta a sensibilidade à insulina, metabolismo, cognição e osteogênese; (iv) reduz a resistência insulínica e as chances de desenvolvimento do DM2, aumentando a sensibilidade do receptor de insulina no músculo esquelético e no tecido cardíaco; (v) melhora o metabolismo hepático da glicose e dos lipídeos e; (v) promove o escurecimento do



TAB (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019). As principais atividades da irisina/FNDC5 estão sumarizados na Tabela 1.

**Tabela 1- Principais atividades fisiológicas mediadas por FNDC5/Irisina.**

<b>Tecido</b>	<b>Ação da irisina/FNDC5</b>
<b>Músculo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Captação de glicose</li> <li>↓ Gliconeogênese</li> <li>↓ Glicogenólise</li> <li>↑ Metabolismo lipídico</li> <li>↑ Captação lipídica</li> </ul>
<b>Tecido adiposo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Escurecimento do TAB</li> <li>↑ Gasto energético</li> <li>↑ Captação de glicose</li> <li>↑ Lipólise</li> <li>↓ Acumulação lipídica</li> </ul>
<b>Pâncreas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Insulina e secreção de glucagon</li> <li>↑ Regeneração da função das células <math>\beta</math></li> <li>↑ Sobrevivência das células <math>\beta</math> protegendo da apoptose</li> </ul>
<b>Ossos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Promove a diferenciação osteogênica</li> <li>↓ Números de osteoclastos</li> <li>↑ Massa cortical óssea e força</li> </ul>
<b>Cérebro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Regulação do apetite</li> <li>Induz a neuroproteção</li> <li>Aumenta a sobrevivência celular</li> <li>Auxilia na diferenciação neural</li> </ul>
<b>Fígado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Glicogênese</li> <li>↓ Glicogenólise</li> <li>↓ Lipogênese</li> <li>Previne o acúmulo de TG hepático</li> </ul>

FNDC5: fibronectina tipo III- contendo domínio 5; TAB: tecido adiposo branco; TG: triglicerídeos. Fonte: Adaptado de Arhire, Mihalache e Covasa (2019).

Nesse sentido, a irisina atua localmente, de maneira autócrina/parácrina, e quando liberada na circulação, age de maneira semelhante a um hormônio, mediando a atividade periférica em vários tecidos e órgãos (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019).

### 1.2.5 Irisina e obesidade

A principal fonte de secreção de irisina/FNDC5 em roedores e humanos ainda ocorre através do musculo esquelético, seguido de adipócitos subcutâneos, e em menores quantidades pelo tecido adiposo visceral (LOPEZ-LEGARREA et al., 2014; PERAKAKIS et al., 2017; ROCA-RIVADA et al., 2013). No entanto, dados recentes mostraram que em indivíduos obesos a irisina é regulada no TAV mas não no tecido adiposo subcutâneo (FRÜHBECK et al., 2020). Experimentos *in vitro* confirmaram a secreção de irisina em pré-adipócitos, adipócitos humanos e em adipócitos 3T3-L1 (HUH et al., 2012). Semelhante a outras adipocinas, o FNDC5 impediu a hiperlipemia induzida por dieta rica em gordura, o acúmulo de lipídeos hepáticos e a oxidação e autofagia de ácidos graxos no fígado (LIU et al., 2016). Além disso, modelos de células animais para o estudo da obesidade verificaram que o FNDC5 atenuou a inflamação do tecido adiposo e a resistência insulínica em macrófagos de camundongos obesos, através da AMPK. Reforçando a ideia de que o FNDC5 pode desempenhar papéis benéficos na prevenção da inflamação, na obesidade e DM2 (XIONG et al., 2018).

Vários estudos examinaram a ligação entre irisina circulante, adiposidade e obesidade em humanos com resultados inconsistentes (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019). Alguns estudos mostram que a condição da obesidade, aumenta os níveis circulantes de irisina. Essa observação apoia a hipótese inicial de que a irisina desempenha um papel compensatório frente a distúrbios metabólicos, como obesidade, comprometimento da homeostase da glicose e resistência insulínica (GUILFORD et al., 2017; KURDIOVA et al., 2014; PÉREZ-SOTELO et al., 2017; ROCA-RIVADA et al., 2013). Similar a resistência a leptina, também foi sugerido um estado de resistência a irisina (PERAKAKIS et al., 2017) ou “irisinemia” (SANCHIS-GOMAR; PEREZ-QUILIS, 2013) dos adipócitos maduros durante a obesidade, impedindo seus efeitos benéficos. Essa resistência seria resultante da secreção excessiva da irisina por adipócitos maduros, na tentativa de alcançar a homeostase metabólica (PERAKAKIS et al., 2017; SANCHIS-GOMAR; PEREZ-QUILIS, 2013). No entanto, outros estudos encontraram uma correlação negativa entre os níveis circulantes de irisina, índice de massa corporal (IMC) (RASHID et al., 2020), a quantidade de tecido adiposo (GRYGIEL-GÓRNIK; PUSZCZEWICZ, 2017) e reduções nas concentrações plasmáticas em pacientes com obesidade mórbida (FRÜHBECK et al., 2020).

### 1.2.6 Irisina e glicose

Nos achados iniciais, Boström et al. (2012) relataram que os animais que se tornaram resistentes à ação da insulina provenientes de uma dieta hiperlipídica; ao serem expostos ao adenovírus expressando FNDC5 tiveram melhora na homeostase glicêmica associadas a redução da insulina plasmática. Desde então, a irisina parece desempenhar um papel ativo na melhoria da homeostase da glicose e níveis mais altos sugerem um potencial terapêutico no controle de comorbidades associadas a obesidade e resistência insulínica (MORENO-NAVARRETE et al., 2013).

Em resumo, a irisina demonstrou estimular a captação de glicose em 30% através da via AMPK, nas células musculares em um mecanismo que provavelmente envolve a translocação de p38 MAPK-GLUT4 (LEE et al., 2015a). Ademais, o tratamento com irisina aumentou em até 80% a expressão de genes envolvidos no transporte de glicose, no metabolismo lipídico dos miócitos e suprimiu em até 40% genes que estão envolvidos na glicogenólise ou gliconeogênese (PERAKAKIS et al., 2017). A irisina promove a proliferação de células  $\beta$  através das vias de sinalização ERK e p38 MAPK e melhora a funcionalidade desse tecido, o que reduziria os níveis de glicose no sangue e melhoraria a tolerância à glicose. Ademais, a irisina previne a apoptose de células  $\beta$  pancreáticas resultantes da hiperglicemia persistente, através da regulação negativa de proteínas pró-apoptóticas (LIU et al., 2017).

### 1.2.7 Irisina e exercício

A manutenção da massa corporal por meio de dieta e treinamento físico é benéfica na prevenção de distúrbios metabólicos associados à obesidade (BASTU et al., 2018; FAGUNDO et al., 2016). Os níveis circulantes de irisina são aumentados em indivíduos treinados e progressivamente reduzidos naqueles menos ativos e sedentários (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019). Dados iniciais demonstraram um aumento de 65% de irisina no plasma de camundongos submetidos a 3 semanas voluntárias de exercício espontâneo (BOSTRÖM et al., 2012). Desde então, diversos exercícios aeróbicos avaliaram a circulação da irisina em humanos e camundongos, incluindo natação, corrida, exercício voluntário. Vários estudos mostram que exercícios aeróbicos de curta duração (ANASTASILAKIS et al., 2014; AYDIN et al., 2014) e

longa duração (BOSTRÖM et al., 2012; KIM et al., 2016) aumentam a concentração de FNDC5 e irisina em humanos e animais.

No entanto, alguns dados falharam em confirmar a resposta de irisina/FNDC5 pelo exercício (PETERSON; MART; BOND, 2014; SAMY; ISMAIL; NASSRA, 2015; SEO et al., 2014; WU et al., 2014). Essas discrepâncias foram explicadas pelo fato de que os níveis de irisina parecem ser afetados por intensidade, duração, frequência semanal, estado nutricional e variabilidade entre espécies (FATOUROS, 2018). Dessa forma, recentes dados mostram que a maioria dos protocolos para avaliar a irisina/FNDC5 utilizaram de intensidade moderada a vigorosa (60% a 90%) com duração de 3 e 21 semanas de 2 a 5 dias por semana, porém trouxeram resultados contraditórios (FATOUROS, 2018). Considerando o estado nutricional, o exercício aeróbico associado a dieta hiperlipídica em animais obesos e não obesos, mostrou elevar a irisina/FNDC5 (BOSTRÖM et al., 2012; KANG et al., 2019; LU et al., 2016; MORTON et al., 2016; SCHAALAN; RAMADAN; ABD ELWAHAB, 2018), enquanto a restrição calórica e a perda de peso parecem reduzir a secreção de irisina (CRUJEIRAS et al., 2014; DE LA IGLESIA et al., 2014; VARELA-RODRÍGUEZ et al., 2016). Por fim, os estudos em animais apontam para diferentes direções, sem unanimidade sobre os efeitos do exercício e regulação termogênica da irisina (FATOUROS, 2018).

### **1.3 Estratégias para o controle da obesidade**

No intuito de controlar os efeitos nocivos da obesidade no remodelamento do tecido adiposo e evitar a instalação de um processo inflamatório, dispositivos farmacológicos tem almejado novos alvos que regulam a massa corporal e atuam sobre o ganho de peso. No entanto, quando o tratamento farmacológico é interrompido, é esperada a retomada do ganho de peso; portanto a terapia deve ser sempre associada a mudanças nutricionais e comportamentais (MANCINI; HALPERN, 2006). Bray et al. (2016) reforçam que os medicamentos centrados na perda de peso, demonstram baixa eficácia na manutenção do peso corporal além de produzir diversos efeitos colaterais (BRAY et al., 2016).

Dentre os métodos propostos para tal finalidade, o treinamento físico e a intervenção dietética são os principais destaques para o controle da expansão do tecido adiposo visceral (VERHEGGEN et al., 2016). Está bem estabelecido, a partir de uma variedade de estudos, que o

treinamento físico e a composição da dieta podem regular a massa corporal (HALL; GUO, 2017), diminuir a gordura abdominal e reduzir o tecido adiposo visceral (ISMAIL et al., 2012; KEATING et al., 2015; MERLOTTI et al., 2017; VERHEGGEN et al., 2016). Dessa forma é preciso destacar os efeitos de cada intervenção no controle de alterações metabólicas.

### 1.3.1 Treinamento Físico

O exercício físico representa a quebra da homeostase de um organismo, devido ao aumento da demanda energética. Dessa forma, um treinamento físico deve proporcionar adaptações cardiovasculares, musculares e hemodinâmicas para suprir a nova demanda metabólica (BRUM et al., 2004). As adaptações cardiovasculares incluem aumento do volume sistólico e débito cardíaco, aumento do consumo máximo de oxigênio. Parte destas adaptações regulam a sinalização da atividade transcricional e traducional do músculo esquelético e adipócitos, que através da secreção de citocinas favorecem o aumento da biogênese mitocondrial e melhoram a flexibilidade metabólica neste tecido (FERGUSON-STEGALL et al., 2011; VIDAL; STANFORD, 2020). O sistema nervoso simpático é o principal responsável pela lipólise e termogênese do tecido adiposo branco frente ao treinamento físico (RODRIGUES et al., 2021; UETA et al., 2012). Durante o exercício, as catecolaminas, especialmente a adrenalina, são responsáveis pela ativação da via de sinalização adrenérgica nos adipócitos, aumentando a atividade lipolítica responsável pela fosforilação de proteínas-chave no processo de lipólise e termogênese aumentando consequentemente a oxidação de ácidos graxos (KEATING et al., 2015; RODRIGUES et al., 2021).

Frente ao exposto, o exercício físico é importante para a manutenção da adiposidade e massa corporal pois resulta no aumento do gasto energético. Dessa forma, a intensidade, volume, frequência e tipo do exercício determinam o gasto de energia. De acordo com a posição do *American College of Sports Medicine (ACSM)* (GARBER et al., 2011), a declaração do *European College of Sport Science* (FOGELHOLM; STALLKNECHT; VAN BAAK, 2006) e a *American College of Cardiology e da American Heart Association* (JENSEN et al., 2014), é recomendado para o controle de sobrepeso e obesidade, a realização de exercício físico por  $\geq 150$  min/semana de exercício de intensidade moderada a vigorosa por semana para a manutenção dos efeitos fisiológicas e adaptações associadas ao treinamento físico. Mas isso não significa que quantidades reduzidas de atividade não sejam benéficas. Um estudo com 416.175 indivíduos mostrou que entre

15 a 100 minutos de exercício por dia, os riscos de mortalidade por todas as causas são reduzidos em cerca de 4% a cada 15 minutos adicionais de exercício (WEN et al., 2011).

Devido à alta capacidade de remodelação do TAB e das funções endócrinas dos adipócitos, a preservação da função do TAB saudável e a diminuição da adiposidade, principalmente a gordura visceral, tem sido considerada uma abordagem atraente para o tratamento ou prevenção de distúrbios metabólicos relacionados à obesidade (KAHN; WANG; LEE, 2019; ROCHA-RODRIGUES et al., 2018a; VERHEGGEN et al., 2016). A redução da gordura visceral está associada à melhora da homeostase da glicose, perfil lipídico e redução do estado inflamatório (CAMPOS et al., 2019; VERHEGGEN et al., 2016). No entanto, alguns estudos observaram que a redução da gordura visceral pode ocorrer sem que haja alteração na massa corporal e, ainda assim, atenuar os distúrbios metabólicos advindos da obesidade (KUK; JANISZEWSKI; ROSS, 2007; VISSERS et al., 2013). Isso, porque é reconhecido que as reduções nos depósitos de gordura abdominal são mais determinantes que as reduções de massa corporal ou IMC no tratamento da síndrome metabólica, uma vez que a obesidade abdominal é o principal indicador da disfunção do tecido adiposo (PALEY; JOHNSON, 2018).

O exercício tanto na forma aeróbica como o de resistência é eficaz em reduzir a gordura ectópica. Dentre as modalidades, o exercício aeróbico de intensidade moderada a vigorosa parece ter um efeito maior no tecido adiposo visceral quando comparado ao treinamento aeróbico de baixa intensidade ou o treinamento de força (VISSERS et al., 2013). Isso inclui a redução da gordura visceral, na gordura hepática e possivelmente na gordura pancreática em adultos com sobrepeso/obesidade e DM2 (SABAG et al., 2017). Níveis mais elevados de exercício físico, especialmente aeróbicos, podem atenuar o risco de doenças cardiovasculares, resistência insulínica e DM2 causados pela obesidade, reduzindo os parâmetros de adiposidade visceral (GAESSER, 2007; HUMLGAN, 2010; LEFEVRE et al., 2009).

Dessa forma, o exercício físico promove benefícios à saúde mesmo que na ausência de perda de peso, caracterizando essa intervenção como mais do que apenas um agente termogênico (PETRIDOU; SIOPI; MOUGIOS, 2019). Ainda assim o aumento do gasto energético é um importante processo alcançado através do treinamento, uma vez que a termogênese mediada pelo exercício promove a metabolização de substratos que atuam na regulação do peso corporal e ativam enzimas que catalisam etapas importantes nas vias catabólicas (BOSTRÖM et al., 2012;

PETRIDOU; SIOPI; MOUGIOS, 2019; WESTERTERP, 2017). Mais especificamente, o consumo de glicogênio hepático e muscular, aumenta a glicogenólise no músculo e no fígado; aumenta a glicólise e a fosforilação oxidativa no músculo; aumenta a lipólise no tecido adiposo e músculo; e a oxidação de ácidos graxos no músculo (PETRIDOU; SIOPI; MOUGIOS, 2019).

### 1.3.2 Intervenção dietética

Uma das estratégias utilizadas para controlar as disfunções metabólicas da obesidade é induzir a um estado de balanço energético negativo. Esse processo tem como intenção resultar na redução do excesso de adiposidade, especialmente visceral, promovendo futuros efeitos positivos no organismo (ROSS; SONI; HOULE, 2020). Para isso, diversas intervenções dietéticas podem ser utilizadas, como restringir a quantidade de calorias ingerida, alteração no padrão e quantidade das refeições ou diferentes combinações na composição da dieta ou macronutrientes. Tanto a restrição da ingestão de calorias quanto de gorduras tem demonstrado resultados efetivos no tratamento da obesidade (ARD; MILLER; KAHAN, 2016).

A intervenção dietética está associada a efeitos positivos na adiposidade e ao menor risco de eventos cardiovasculares por promover redução acentuada da adiposidade, declínio da massa corporal e aumento da oxidação de gorduras (DE JESUS; KAHAN; ECKEL, 2016; HALL et al., 2015). A alteração na proporção de macronutrientes, como as proteínas, carboidratos e lipídeos têm efeitos diferentes no metabolismo energético e podem induzir a perda de peso e mudanças de composição corporal (ARD; MILLER; KAHAN, 2016). Já foi evidenciado que durante a ingestão *ad libitum*, há diferenças na resposta oxidativa entre dietas isocalóricas com alto teor de gordura quando comparada a dietas com baixo teor de gordura. Isso ocorre porque o aumento da ingestão de gordura está vinculado a respostas termogênicas mais lentas, que correspondem a uma redução de aproximadamente 30% na termogênese (MAFFEIS et al., 2001). Benefícios adicionais incluem melhorias no perfil lipídico, com redução do colesterol total, triglicerídeos, e da lipoproteína de baixa densidade; mas parece não alterar o metabolismo da glicose (LU et al., 2018; WILLEMS et al., 2021).

O mecanismo através do qual a dieta com redução de gorduras induz a oxidação de ácidos graxos e redução da adiposidade ainda não está completamente elucidado. Dentre as hipóteses formuladas a preservação de macromoléculas associadas a sobrevivência celular é essencial em

processos metabólicos quando existe escassez de nutrientes, levando o organismo a uma reprogramação dos substratos disponíveis (SMITH et al., 2018). Especialmente a redução da ingestão energética leva à ativação de uma cascata de sinalização para fornecer combustível ao organismo (DUSZKA et al., 2020). Dessa forma, em situações de depleção energética no organismo, ocorre um retardo na conversão de ADP em ATP o que aumenta razão AMP/ATP e ADP (CUI et al., 2013; DUSZKA et al., 2020). A molécula de AMPK funciona como principal sensor energético das relações AMP/ATP e ADP/ATP (DUSZKA et al., 2020). Em mamíferos, dentre os mecanismos propostos de ativação, a AMPK desempenha um papel central. As funções da AMPK implicam que sua ativação pode participar na mediação dos efeitos benéficos da intervenção dietética (CUI et al., 2013).

Uma vez ativada, a AMPK promove a preservação do ATP ao suprimir vias que consomem energia e aumentam a expressão de proteínas envolvidas no catabolismo. Este processo resulta na mobilização da energia para reestabelecer o suprimento de ATP ao organismo, aumentando a expressão de fatores que resultam na inibição da síntese de ácidos graxos, colesterol e TG, enquanto ativa a captação de ácidos graxos e  $\beta$ -oxidação (DUSZKA et al., 2020). Adicionalmente, a redução no consumo de gorduras pode induzir a elevação da proteína UCP-1 em adipócitos brancos que induzem a transdiferenciação para adipócitos bege e portanto são responsáveis pelos efeitos positivos sobre a adiposidade e o metabolismo energético (SHIRKHANI et al., 2018).

### **1.3.3 Combinação de intervenção dietética e exercício**

Como discutido acima, tanto a dieta quanto o exercício físico induzem a melhorias no perfil metabólico e parâmetros de adiposidade associados a obesidade (VERHEGGEN et al., 2016). Ademais, são importantes no controle de fatores de risco, além de diminuir o risco de doenças cardiovasculares, DM2 e mortalidade (CLARK, 2015). Portanto, parece provável que a combinação das duas intervenções potencialize os efeitos de ambas na redução da obesidade.

Existe um crescente corpo de literatura que geralmente recomenda a combinação de treinamento e intervenção dietética para a redução significativa da massa corporal (VERHEGGEN et al., 2016). A combinação de intervenção dietética e exercício, tanto resisitido quanto aeróbico, promovem efeitos superiores a intervenção da dieta de forma exclusiva na redução da massa



corporal e massa de gordura corporal, preservando a massa livre de gordura. Ainda são eficazes em promover efeitos positivos nos níveis hormonais e perfil lipídico no sangue (CLARK, 2015). Embora o treinamento promova uma perda de peso significativo a curto prazo, o resultado é potencializado quando o exercício físico é combinado com a intervenção dietética. Ademais essa associação evita de forma mais efetiva o reganho de peso (IOM, 2004). No entanto, alguns achados mostraram que a combinação das intervenções não potencializaram a prevenção dos fatores de risco para eventos cardiovasculares quando comparados a intervenção dietética de forma isolada (NICKLAS et al., 2009).

Em suma, a disfunção metabólica resultante da obesidade pode levar a doenças crônico-degenerativas que produzem efeitos deletérios no organismo. Especialmente a gordura visceral, que é considerada a protagonista nos efeitos sistêmicos e inflamatórios causados pela obesidade. Dessa forma preservar a função saudável do TAB e prevenir o ganho de peso, especialmente do tecido adiposo visceral deve ser uma prioridade.

Parte da baixa eficiência no gerenciamento da obesidade, se deve a lacuna de conhecimento que ainda persiste em fatores que atuam na regulação da massa corporal e da massa de gordura. Embora seja conhecido o papel da obesidade na produção de alterações que prejudicam o funcionamento dos adipócitos brancos, recentemente fatores que interferem na obesidade vêm sendo descobertos bem como seus efeitos nas células adiposas, como a irisina/FNDC5 e marcadores inflamatórios/anti-inflamatórios. Nesse sentido, estudos adicionais são necessários para explorar os fatores secretados pelo tecido adiposo e muscular que promovem ações corretivas e fisiológicas no processo da obesidade e na resposta as estratégias para o tratamento da obesidade. Ademais, diferenças entre o tecido adiposo subcutâneo e visceral tem sido reportado de forma extensiva na literatura. No entanto, os diferentes compartimentos do tecido adiposo visceral possuem características específicas que provavelmente respondem de forma particular a indução da obesidade e as intervenções para manutenção da obesidade. Desse modo, se faz necessário a compreensão do funcionamento desses depósitos e consequentemente suas ações no processo da obesidade e tratamento.

Adicionalmente, a transdiferenciação do TAB em um tecido adiposo termogenicamente ativo pode ser um potencial terapêutico no controle da obesidade. Evidências sugerem que moléculas dependentes do músculo podem promover o escurecimento e aumentar o gasto de

energia e reduzir a massa de gordura corporal em humanos. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais o exercício exerce seus efeitos positivos no organismo ainda precisam de mais esclarecimentos. Desde então pesquisadores exploram essas relações a fim de desenvolver mecanismos supra fisiológicos ou drogas que mimetizem os efeitos do exercício (CASTILLO-QUAN, 2012). Portanto, os resultados dessa pesquisa irão facilitar a compreensão de moléculas envolvidas no escurecimento do TAB com o objetivo final de desenvolver novas terapêuticas para o tratamento da obesidade.

## 2 HIPÓTESES

A dieta hiperlipídica por 8 semanas será eficiente em promover o fenótipo obeso com aumento da adiposidade visceral, deposição ectópica em órgãos adjacentes e aumento dos marcadores inflamatórios sistêmicos além de aumentar a concentração de marcadores associados a regulação energética, como leptina;

O treinamento aeróbico e a intervenção dietética de forma independente irão promover efeitos positivos sobre o metabolismo da glicose e dislipidemia, irão atenuar o ganho de massa corporal e adiposidade visceral, conseqüentemente reduzindo as concentrações de marcadores inflamatórios; além de aumentar a secreção de adipocitocinas a fim de promover correções fisiológicas resultantes da obesidade;

A combinação da intervenção dietética e treinamento aeróbico vão potencializar as respostas observadas de forma independente através das intervenções e serão reafirmadas como estratégias para atenuar as disfunções metabólicas advindas da obesidade;

A irisina/FNDC5 irão aumentar frente ao treinamento aeróbico e reduzir frente a intervenção dietética. Ainda, a combinação da intervenção dietética e treinamento aeróbico irão elevar a irisina/FNDC5.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este estudo pretende determinar a modulação de irisina, marcadores inflamatórios, parâmetros da composição corporal e depósitos adiposos viscerais frente à intervenção dietética e treinamento físico.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia de 8 semanas de dieta hiperlipídica na indução da obesidade em ratos, quanto a composição corporal, depósitos de tecidos adiposos e dosagens bioquímicas;
- Avaliar os efeitos de 4 e 8 semanas do treinamento físico aeróbico sobre as concentrações de irisina circulante, expressão de FNDC5 no gastrocnêmio, e os parâmetros de composição corporal, adiposidade visceral e biomarcadores relacionados à obesidade de animais alimentados com dieta hiperlipídica;
- Avaliar os efeitos de 4 e 8 semanas de intervenção dietética sobre as concentrações de irisina circulante, expressão de FNDC5 no gastrocnêmio, e os parâmetros de composição corporal, adiposidade visceral e biomarcadores relacionados à obesidade de animais alimentados com dieta hiperlipídica;
- Quantificar as concentrações dos marcadores inflamatórios no soro: TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , irisina; TG; HDL glicemia; insulina e, calcular a partir desses valores o índice HOMA-IR e VLDL;
- Determinar os parâmetros de composição corporal: massa corporal (MC), percentual de gordura corporal (%GC), área corporal (AC), massa livre de gordura (MLG), massa de gordura (MGC) e, densidade mineral óssea (DMO) e;
- Avaliar a morfometria de adipócitos dos tecidos adiposos viscerais: EPI, RET e MES e, fígado.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados sessenta e seis ratos machos *Wistar* (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*). Os ratos foram obtidos no biotério central da UFSCar ( $\cong 300\text{g}$ ) e foram alimentados com ração padrão de laboratório até completarem 107 dias de idade, para permitir que se ajustassem ao novo ambiente. Os animais foram alocados de forma randomizada, baseada na estratificação da massa corporal por quartil (primeira e segunda intervenção) em grupos de 3 a 4 em caixas opacas de polipropileno com tampas de aço inoxidável em condições ambientais controladas: temperatura de  $23 \pm 1$  °C, umidade de 50-60%, ciclo claro escuro invertido (ciclo escuro: das 06:00 às 18:00 e ciclo claro: das 18:00 às 06:00) e tiveram acesso *ad libitum* a água e alimentos. O protocolo experimental durou 16 semanas. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 7631210617) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

### 4.2 Protocolos experimentais

#### 4.2.1 Primeira intervenção- Indução da obesidade

Ao completarem 107 dias, 66 animais foram subdivididos de forma randomizada para receber uma das seguintes dietas durante 8 semanas: dieta padrão ou dieta hiperlipídica.

Grupo dieta padrão (CD): composto por 7 animais que receberam dieta padrão por 8 semanas e sofreram eutanásia;

Grupo dieta hiperlipídica (HFD): composto por 59 animais que receberam dieta hiperlipídica por 8 semanas. Dos 59 animais que receberam a dieta, 7 animais desse grupo foram eutanasiados ao final de 8 semanas, para caracterização da obesidade e posteriores análises. Os 52 animais restantes seguiram para a intervenção subsequente.

#### 4.2.2 Segunda intervenção- Treinamento e intervenção dietética

Após 8 semanas recebendo dieta hiperlipídica para indução da obesidade, os 52 animais restantes do grupo obeso, foram subdivididos em 4 grupos:

Grupo dieta hiperlipídica treinado (HFD-Ex): composto por 14 animais que mantiveram o consumo de dieta hiperlipídica e foram submetidos ao protocolo de exercício;

Grupo dieta hiperlipídica sedentário (HFD-Sed): composto por 11 animais que mantiveram o consumo de dieta hiperlipídica e não foram submetidos ao protocolo de exercício;

Grupo dieta padrão treinado (CD-Ex): composto por 14 animais que foram submetidos a intervenção dietética e, portanto, retornaram o consumo à dieta padrão e foram submetidos ao protocolo de exercício;

Grupo dieta padrão sedentário (CD-Sed): composto por 13 animais que foram submetidos a intervenção dietética e, portanto, retornaram o consumo à dieta padrão e não foram submetidos ao protocolo de exercício.

#### **4.2.3 Composição das dietas**

Para a produção da dieta os ingredientes foram distribuídos na proporção de 3:2:2:1, previamente padronizada por Estadella et al. (2004) e utilizado desde então para indução da obesidade (COSTA et al., 2021; DUARTE et al., 2008; OISHI et al., 2018; SENE-FIORESE et al., 2008). A cada 100g foram utilizados 37,5g de ração padrão da marca Agromix (Jaboticabal, SP, Brasil); 25g de amendoim torrado; 25g de chocolate ao leite; 12,5g de bolacha maisena. Os ingredientes secos foram pesados em balança de precisão (Marte Científica AS 2000C, São Paulo, SP, Brasil), posteriormente triturados, homogeneizado e modelado em forma de pellets.

A dieta foi preparada semanalmente e armazenada em sacos plásticos contendo em média 1 kg, a temperatura de – 20 °C. A dieta padrão foi oferecida aos animais que compuseram o grupo dieta padrão *ad libitum*. A composição centesimal das dietas (Tabela 2) foi estimada através da bromatologia.

**Tabela 2 - Composição centesimal da dieta**

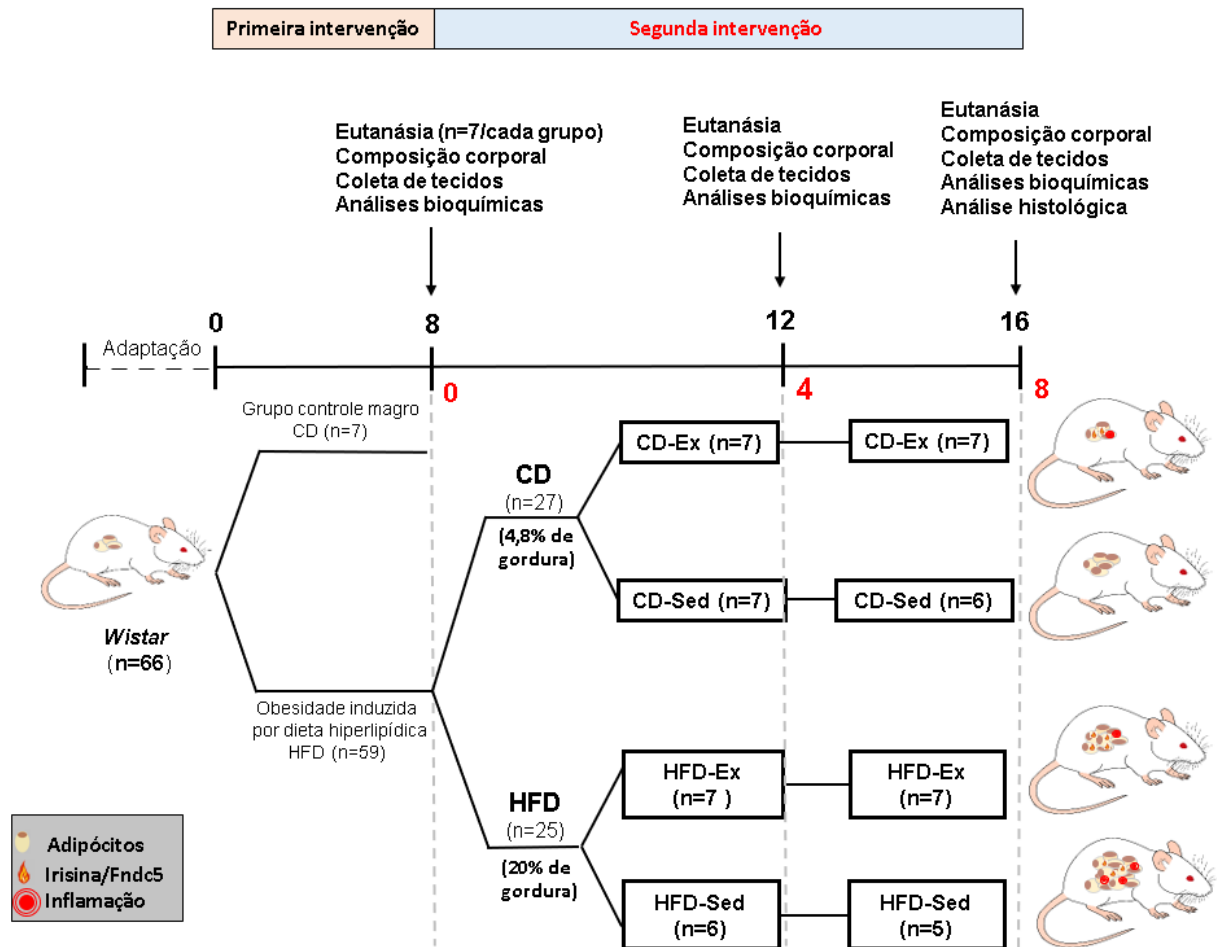
	<b>HFD</b>	<b>CD</b>
<b>Valor energético (cal/g)</b>	4.665,00	3.854,00
<b>Umidade e voláteis (%)</b>	14,72%	12,47%
<b>Gordura (%)</b>	20	4,80
<b>Carboidratos (%)</b>	32,90	39,23
<b>Proteína (%)</b>	18,12	22,81
<b>Fibras (%)</b>	2,97	5,82
<b>Matéria mineral (%)</b>	3,29	6,87
<b>Potássio (%)</b>	0,60	1,26
<b>Cálcio (%)</b>	0,52	1,2
<b>Sódio (%)</b>	0,14	0,22
<b>Vitamina A (UI/kg)</b>	1.149,00	25.000,00
<b>Vitamina D3 (UI/kg)</b>	836,90	4,000,00
<b>Vitamina E</b>	229,94 mg/kg	80,00 UI/kg
<b>Maltose (%)</b>	Não detectado	Não detectado
<b>Xilose livre (%)</b>	Não detectado	Não detectado
<b>Glicose livre (%)</b>	0,12%	Não detectado
<b>Frutose livre (%)</b>	0,17%	Não detectado
<b>Sacarose (%)</b>	12,49%	1,65%
<b>Lactose (%)</b>	1,88%	Não detectado
<b>Galactose livre (%)</b>	Não detectado	Não detectado
<b>Rafinose (%)</b>	0,30%	0,74%

CD: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica. Fonte: Adaptado de Costa et al. (2021).

#### 4.2.4 Desenho experimental

Após as 8 semanas da primeira intervenção os animais sofreram eutanásia por decapitação (Figura 4). Após 4 e 8 semanas após o início da segunda intervenção os animais sofreram eutanásia (n= 5-7) por decapitação, como mostra o esquema abaixo:

**Figura 4 - Esquema representativo dos grupos, protocolos experimentais e eutanásia.**



Os animais foram induzidos a obesidade por 8 semanas. Após as 8 semanas da primeira intervenção os animais foram eutanasiados. Após 4 e 8 semanas (números destacados em vermelho na linha do tempo) durante a segunda intervenção os animais foram eutanasiados para coleta dos tecidos, avaliação dos parâmetros metabólicos e de composição corporal. HFD: grupo dieta hiperlipídica; CD: grupo dieta padrão; HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. Fonte: elaborado pelo próprio autor.



#### 4.2.5 Adaptação ao treinamento e divisão dos grupos

O período de adaptação teve o objetivo de minimizar o comportamento de “stop and go” visualizado no modelo *Wistar* durante a atividade de corrida; reduzir o estresse e, aperfeiçoar a mecânica de movimento dos animais sem necessariamente promover adaptações fisiológicas (KUNSTETTER et al., 2018). Dessa forma, antes de iniciar o protocolo de treinamento, na oitava semana de experimentação, os animais foram adaptados a corrida na esteira ergométrica adaptada para ratos durante 5 dias consecutivos adaptado de Lee et al. (2015) (LEE et al., 2015b). A duração e velocidade de cada sessão está descrita na Tabela 3:

**Tabela 3 - Protocolo de adaptação na esteira**

	Dias 1 e 2	Dias 3 e 4	Dia 5
<b>Intensidade</b>	6 m/min	8 m/min	10 m/min
<b>Duração</b>	10 min	12 min	15 min

min: minutos; m/min: metros/minutos. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Como forma de seleção dos animais para compor os grupos exercitados, os animais foram avaliados quanto a sua adaptabilidade a atividade de corrida e padrão de movimento durante todo o período de adaptação perante o uso da tabela proposta por Rachetti et al. (2013), como descrito na Tabela 4. Foram selecionados os animais que apresentaram a maior média de nota após as cinco sessões de adaptação ao treinamento físico (valores da tabela entre 3 e 5) (RACHETTI et al., 2013).

**Tabela 4 - Medida para avaliação do desempenho dos animais durante a adaptação**

Classificação	Desempenho
1	Recusou-se a correr
2	Corredor abaixo da média- esporádico, para e vai, sentido errado
3	Corredor na média
4	Corredor acima da média- consistente, ocasionalmente caiu para trás na esteira
5	Bom corredor- permaneceu consistentemente, na frente da esteira

Fonte: Adaptado de Rachetti et al., (2013).

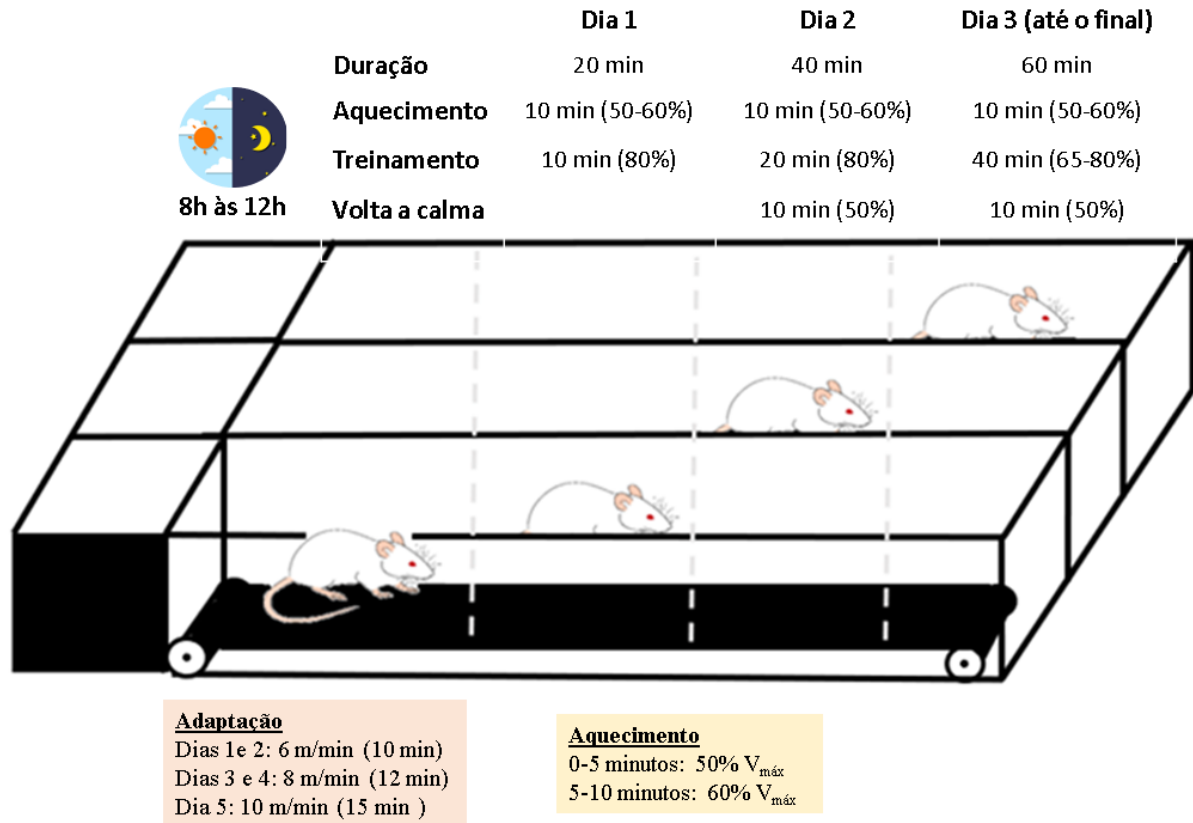
#### 4.2.6 Protocolo de teste máximo

O protocolo de teste máximo foi realizado no sexto dia após a adaptação (ou seja, dois dias antes do início do treinamento) para determinar a velocidade máxima e intensidade do treinamento. O mesmo teste foi repetido quatro semanas após o início do treinamento para reajuste da velocidade máxima para as próximas sessões e, depois do período de treinamento físico para avaliação final. A intensidade de exercício foi estimada pela distância total percorrida e velocidade máxima obtida no último estágio do teste de esforço (BROOKS; WHITE, 1978). O teste de esforço em esteira começou com velocidade de 6m/min sem nenhuma inclinação, aumentando a velocidade 2 m/min a cada 2 minutos, até a fadiga dos animais (BROOKS; WHITE, 1978; SOUZA et al., 2018). Foi determinado como exaustão a incapacidade do animal em manter o padrão de movimento e acompanhar a velocidade da esteira imposta no determinado estágio, mesmo após estímulos na cauda. O tempo da fadiga (em minutos) e a velocidade máxima (em metros/minutos) foram determinados como 100% da capacidade de exercício e usados para a determinação da intensidade das sessões de treinamento. Durante a adaptação, teste de esforço e treinamento físico utilizamos da pressão manual aplicada na parte distal da cauda como forma de estímulo para a manutenção da corrida. Não foi utilizado choque elétrico como forma de estímulo.

#### 4.2.7 Protocolo de treinamento

O protocolo de treinamento aeróbico contínuo consistiu em sessões de corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos, contendo seis pistas individuais separadas entre si por baias feitas em acrílico, sempre entre as 8-12 horas respeitando o ciclo claro-escuro dos animais. O protocolo teve frequência de três sessões semanais, por oito semanas, com duração de 60 minutos por sessão na intensidade moderada, correspondendo a 65-80% (parte principal) da velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) obtida no teste de esforço, e 0% de inclinação. No primeiro dia de treinamento, os animais realizaram o protocolo durante 20 minutos, com um aquecimento de 10 minutos (50-60% da  $V_{m\acute{a}x}$ ) e 10 minutos de treinamento a intensidade de 80% da  $V_{m\acute{a}x}$ . No segundo dia de treinamento, os animais realizaram o protocolo durante 40 minutos, com um aquecimento de 10 minutos, 20 minutos na parte principal (80% da  $V_{m\acute{a}x}$ ) e 10 minutos de volta a calma. Do terceiro dia e até o final do experimento, foram mantidas a mesma intensidade e duração dos treinos até o final do treinamento conforme apresentado na Figura 5.

**Figura 5 - Protocolo de adaptação e treinamento dos animais.**



Os animais do grupo de treinamento, foram submetidos a um protocolo aeróbico contínuo em esteira ergométrica, entre as 8-12 horas. O protocolo teve frequência de três sessões semanais, por oito semanas, com duração de 60 minutos por sessão, na intensidade moderada.  $V_{máx}$ : velocidade máxima; m/min: metros/minutos; min: minutos. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Cada sessão de treinamento foi fracionada em três partes, sendo 10 minutos para aquecimento (0-5 minutos: 50% da  $V_{máx}$  e 5-10 minutos: 60% da  $V_{máx}$ ), 40 minutos para a parte principal (65-80% da  $V_{máx}$ ) e 10 minutos de volta a calma (50% da  $V_{máx}$ ). Tendo em vista adaptações inerentes a prática do treinamento físico e mecânicas que aumentam a capacidade do esforço físico, os animais realizaram um reteste de esforço máximo quatro semanas após o início do treinamento (conforme previamente mencionado), e as intensidades das sessões foram posteriormente reajustadas. Os animais exercitados foram eutanasiados 48 horas após a última sessão de esforço físico, a fim de reduzir os efeitos agudos promovidos pelo treinamento.

### 4.3 Perda amostral

Durante a intervenção inicial até 4 semanas, 1 animal do grupo HFD-Sed, morreu de causas não identificadas. Durante a segunda intervenção, de 4 a 8 semanas, 1 animal do grupo CD-Sed e 1 animal do grupo HFD-Sed, morreram de causas não identificadas.

### 4.4 Coleta dos tecidos

Os tecidos adiposos epididimal (EPI), retroperitoneal (RET) e mesentérico (MES), fígado, pâncreas, gastrocnêmio, sóleo e EDL foram dissecados, pesados e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posteriormente serem armazenados em freezer a -80 °C. As massas dos tecidos foram relativizadas em relação a massa corporal:

$$\text{Massa relativa dos tecidos (g/100g)} = \text{Massa absoluta dos tecidos} \times 100 / \text{Massa corporal}$$

### 4.5 Controle de massa corporal e consumo alimentar

A massa corporal de cada animal e o consumo alimentar foram avaliados a cada 2-3 dias, entre 8 e 12 horas (período matutino) durante todo o período experimental. A dieta foi oferecida três vezes por semana e a ingestão alimentar foi calculada pela diferença de peso entre a quantidade de comida ofertada subtraindo a quantidade restante de comida (Consumo Alimentar (g) = ração ofertada – sobra da ração ofertada). A ingestão energética por rato (kcal/rato) foi calculada como: consumo alimentar\*Et (Et é a energia total da dieta alimentar que é 4.665, 00 cal/g na HFD e 3.854,00 cal/g) (adaptado de Gong et al. (2016).

### 4.6 Composição corporal

A avaliação da composição corporal foi realizada antes das eutanásias de 4 e 8 semanas de intervenção. Os animais foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (32mg/kg) e posteriormente foram posicionados em decúbito ventral para serem escaneados pelo equipamento DEXA (Densitometria de Emissão de Dupla) (Hologic Inc., Bedford, MA, 4500). Dessa forma, foram obtidas a %GC, AC, MLG, MGC e DMO. As análises de imagem foram realizadas através do software QDR 4500 (Hologic®).

## **4.7 Análises bioquímicas**

### **4.7.1 Glicose e Insulina**

A dosagem da glicose plasmática foi realizada utilizando um glicosímetro Accu-Check (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA) após 12 horas em jejum. Foi realizada uma punção na veia caudal do animal para obtenção da gota de sangue. A insulina (ER1113) foi analisada de forma sérica através ensaio de ELISA com o soro coletado após a eutanásia.

O índice HOMA-IR (modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina) é um método que se baseia na glicose e insulina plasmática e tem sido utilizado para definir a resistência insulínica (MATTHEWS et al., 1985). Para isso, foi calculado o índice HOMA-IR através da fórmula: insulina de jejum (ng/ml) X glicemia de jejum (mg/dl)/405 (ROZA et al., 2016).

### **4.7.2 Perfil lipídico**

As determinações bioquímicas das frações lipídicas foram realizadas através de ensaio enzimático colorimétrico por kits Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brasil) após 12 horas em jejum. Colesterol total monoreagente (CT) (Ref. K083- Bioclin), HDL (Ref. K015- Bioclin) e TG (Ref. K117- Bioclin) foram avaliados e o ensaio seguiu as recomendações do fabricante. As lipoproteínas VLDL foram calculadas a partir do triglicerídeos, através da fórmula: TG/5 (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972).

### **4.7.3 Análise bioquímica de irisina, leptina, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ e insulina**

O kit de irisina (MET-5089) foi adquirido pela Cell Biolabs (San Diego, USA). As citocinas IL-1 $\beta$  (ab255730), e leptina (ab100773) foram adquiridas pela Abcam ® (Cambridge, Reino Unido). As citocinas IL-10 (nº. 555134) e TNF- $\alpha$  (nº. 558535) foram adquiridas pela BD Biosciences Pharmingen (San Diego, Califórnia, EUA). O kit de insulina (ER1113) foi adquirido pela Fine Biotech Co., Ltd (Wuhan, China). A análise foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, sob a supervisão da Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal.

A determinação da concentração sérica das citocinas e adipocinas foi realizada a partir do soro centrifugado através de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). Após a eutanásia o

sangue foi previamente coletado e acondicionado em tubos sem anticoagulante por aproximadamente 30 minutos até a sua coagulação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1500 xg por 10 minutos (Hettich® Universal 320R). O soro resultante desta centrifugação foi aliquotado em microtubo e congelado a -80 °C até o momento das análises.

A técnica de ELISA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. De forma geral, foram adicionados 50-100 µL de cada amostra (duplicadas) às placas de alta afinidade sensibilizadas com anticorpos anti-citocinas. Após a incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem específico de cada citocina e incubadas com anticorpos anti-citocinas biotinizados ou conjugado com enzima peroxidase. Após a incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas com solução de substrato (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine). A reação enzimática foi bloqueada com solução stop (ácido sulfúrico 0,5N) e a leitura foi realizada imediatamente no espectrofotômetro em 450nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva de titulação dos padrões e as concentrações finais expressas em pg/ml ou ng/ml dependendo do kit.

#### **4.8 Western Blotting**

A proteína FNDC5 foi quantificada no tecido gastrocnêmio através da técnica de *Western Blotting*. Para a obtenção do extrato proteico, os tecidos foram processados em um de tampão de extração proteica (SDS 0,1 % (p/v); Triton 1 % (v/v); Tris-HCl ph 7,8; 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 15 mM; EGTA 5 mM) adicionado de inibidores de protease Complete-mini Roche® (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Em seguida os tecidos foram processados no equipamento FastPrep-24™ (MP Biomedicals, Solon, OH, EUA) para homogeneização dos tecidos e posteriormente foram centrifugados 10.000 rpm (Eppendorf ® 5430R); por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em microtubos permanecendo a -80 °C até o momento das análises. A quantificação proteica foi baseada na curva padrão em relação a concentração, através do ensaio colorimétrico de proteínas à base de ácido bicinconínico (BCA, AR0146-500), de acordo com as instruções do fabricante (Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, EUA). As amostras foram acondicionadas em placas de ELISA (NEST Biotechnology, Wuxi, Jiangsu, China) para leitura e analisadas no leitor de microplacas SpectraMax i3 através do Software (SoftMaxPro, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, Estados Unidos). As amostras foram calculadas para manter a concentração de 60 µg em um volume final de 20µl por poço do gel.

Os lisados proteicos foram separados por eletroforese em um gel de 15% SDS-PAGE com auxílio de minicubas verticais (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Estados Unidos). As proteínas do gel foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema submerso de acordo com as instruções do fabricante (GE HealthCare, Marlborough, MA, EUA). Em seguida, a membrana foi bloqueada com uma solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em TBST) por 1 hora em temperatura ambiente e agitação constante. Finalmente, a membrana foi incubada com anticorpo primário FNDC5 (ab174833; 1: 1.000; Santa Cruz®) diluídos em 5% de leite desnatado em TBST durante a noite (aproximadamente 17 horas). No dia seguinte, prosseguiu-se com a lavagem de 3 ciclos por 10 minutos cada em TBST. As membranas então foram lavadas e incubadas com goat anti-rabbit IgG-HRP diluídos em TBST (sc-2004; 1:2.500; Santa Cruz®). Como controle endógeno as membranas foram incubadas durante a noite (aproximadamente 17 horas) com anti-GAPDH (ab181602, Abcam/ MAB5718, R&D System). No dia seguinte, prosseguiu-se com a lavagem de 3 ciclos por 10 minutos cada em TBST. As membranas então foram incubadas com um anticorpo secundário apropriado: anti-rabbit (1:10.000, sc2357, Santa Cruz) ou anti-mouse (1:5.000, sc516102, Santa Cruz) durante 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo ligado à membrana foi detectado usando o método quimioluminescente aprimorado (ECL) de Amersham (GE HealthCare, Marlborough, EUA) a detecção quimioluminescente foi feita pelo equipamento Chemidoc (Bio Rad). A intensidade das faixas identificadas foi quantificada por densitometria usando o software de imagem ImageJ (National Institutes of Health) e é relatada em unidades arbitrárias.

#### **4.9 Análise histológica**

Para análise histopatológica, o lobo caudado do fígado, e um fragmento dos tecidos EPI, RET e MES foram colocados em cassetes histológicos e inseridos em um tubo com 10% de formalina por grama por 48 horas. Após a fixação, os tecidos foram transferidos para um recipiente contendo álcool 70% (volume igual ao usado para a formalina) até o momento das análises. Para a histologia o tecido foi desidratado por 1 hora em álcool 90%, 1 hora em álcool absoluto e em seguida, foi realizada uma troca e as amostras foram deixadas *overnight* em álcool absoluto. No dia seguinte foram realizadas mais 2 trocas de álcool absoluto (1 hora) e então os tecidos foram diafinizados a cada 1 hora com 50% xilol (3 vezes). Após a diafinização, o tecido foi impregnado por 1 hora em parafina de 58-62°C; e a 60°C com parafina *overnight*. No dia seguinte, o tecido foi

impregnado mais 1 hora em parafina de 58-62°C. Por fim, os tecidos foram incluídos em parafina histológica (Merck Milipore, São Paulo, Brasil).

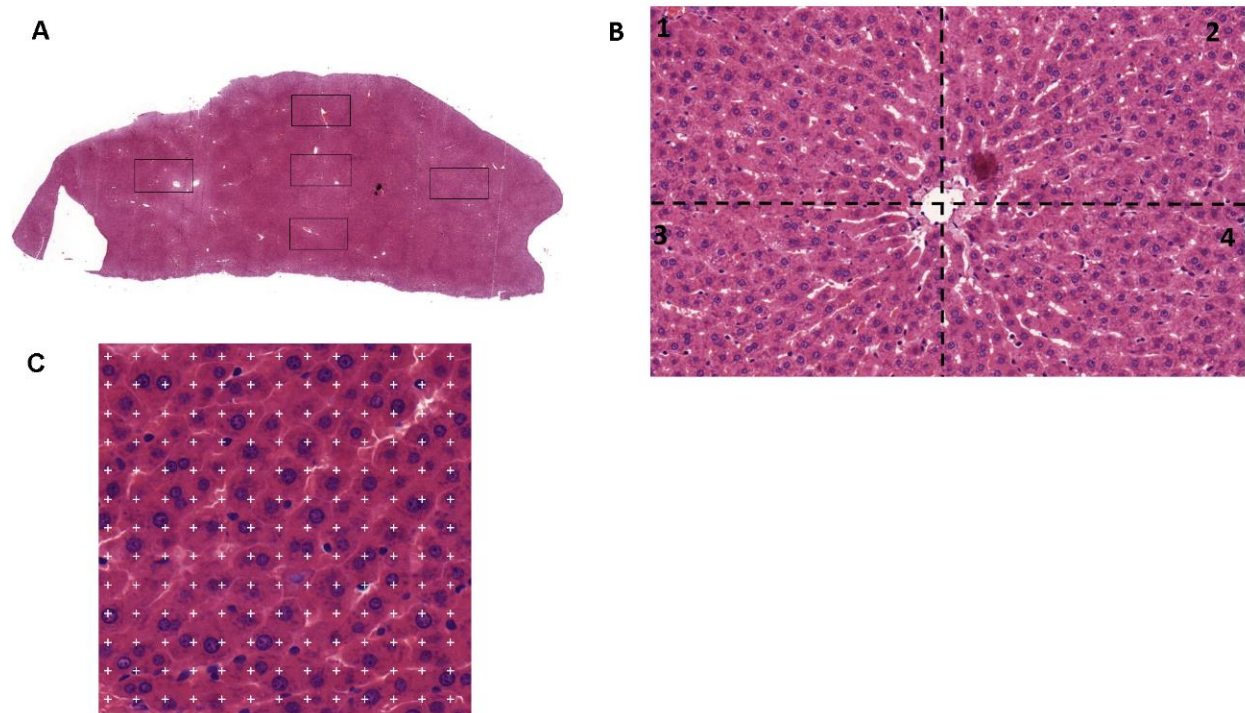
Depois da inclusão em parafina, as amostras de tecido incorporadas foram cortadas por micrótomo rotativo, com cortes de 5 µm de espessura. Para expansão, o tecido foi mergulhado em álcool e depois levado a um banho maria de 40–42°C por 1 minuto para melhor aderência a lâmina. Duas secções de tecido foram então colocadas em lâminas de microscópio e ficaram secando na estufa por um período de 24 h. O tecido foi então desparafinado em xilol, hidratado em banhos crescentes de álcool e reidratado em água destilada. Subsequentemente, os cortes foram corados em hematoxilina e eosina (HE) e enxaguado em água corrente para remover o excesso de corante. Após esse processo, o tecido foi desidratado em álcool absoluto e clarificado com xilol até montagem permanente com resina Permount (Fisher Chemical™). As lâminas coradas com HE foram escaneadas (3D Histech Pannoramic Desk BF) e digitalizadas utilizando-se o programa Pannoramic Viewer.

#### **4.9.1 Análise das secções histológicas do fígado**

Para analisar as imagens histológicas após a oitava semana de intervenção foram pré-determinadas 5 áreas aleatórias: 4 áreas nas extremidades (inferior, superior, direita, esquerda) e 1 área no centro da imagem (Figura 6A).



**Figura 6 - Análise das secções histológicas do tecido hepático.**



(A) Áreas aleatórias pré-determinadas para avaliação da histologia; (B) Determinação dos 4 quadrantes a partir da veia centrolobular; (C) A densidade da esteatose foi avaliada por contagem contendo 390 pontos sobrepostos na fotomicrografia. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Após a determinação, em cada área, foram selecionados mais 4 quadrantes a partir da localização da veia centrolobular em uma ampliação de 20x (100  $\mu\text{m}$ ). Um total de 20 campos histológicos por amostra foram analisados. A análise morfométrica foi realizada utilizando Image J (*National Institutes of Health*). A esteatose hepática foi avaliada pela estimativa da densidade do volume de gotículas de gordura (Vv) nos hepatócitos (CATTAPRETA et al., 2011). O Vv foi estimado por pontos contados usando a fórmula  $Vv = PP / PT$ , onde PP é o número de pontos que coincidem com a gotícula de lipídeos e PT é o número total de pontos (NOVAES et al., 2013). As células binucleadas foram avaliadas utilizando a mesma fórmula, em que PP representava o número de pontos que continham células binucleadas. Foram definidos um total de 390 pontos no total em uma área total de (At) de  $3,12 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ .

#### 4.9.2 Análise das secções histológicas dos adipócitos

Para análise das imagens, cinco campos de cada amostra foram coletados com ampliação de 20x para quantificação. Os arquivos foram analisados quanto à área de adipócitos pelo plugin

Adiposoft (v. 1.15) do ImageJ Fiji (v 2.0.0) (GALARRAGA et al., 2012; PARLEE et al., 2014). O plug-in Adiposoft foi equalizado com um diâmetro entre 25 e 200  $\mu\text{m}$ . Para cada condição foi selecionada uma amostra de  $n=5$  e 100 células adiposas por animal foram avaliadas. A frequência de distribuição relativa foi calculada através do o Graph-Pad Prism Versão 8.0 (FERLAND et al., 2020; PARLEE et al., 2014).

#### **4.10 Incorporação de lipídeos**

Para determinar o conteúdo de lipídeos totais no fígado foi utilizada a técnica adaptada por Stansbie et al. (1977). Para isso, 1g de tecido foi pesado em balança analítica e incubado com 3 ml de KOH (30%) no banho maria a 70 °C por 15 minutos. Foram então adicionados 3 ml de etanol absoluto e ficaram incubados por mais 1 hora e 45 minutos a 70 °C. Após essa etapa, a solução foi resfriada em temperatura ambiente por 10 minutos. Foi acrescentado 2,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N com os tubos no gelo e 8 ml de éter de petróleo e agitação constante por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e mais 6 ml de éter de petróleo foram adicionados e agitados por mais 10 minutos. Após agitação, o sobrenadante foi retirado e mais 4 ml de éter de petróleo foram adicionados e agitados por mais 10 minutos. Após agitação, o sobrenadante foi retirado e mais 2 ml de éter de petróleo foram adicionados e agitados por mais 10 minutos. Após a agitação final, o tubo foi lavado com água destilada e o decantado foi aspirado. O conteúdo foi transferido para um tubo de cintilação e evaporado na capela (STANSBIE et al., 1977). Após total evaporação os frascos foram pesados para determinar a porcentagem do conteúdo lipídico, através da fórmula:  $[\text{peso final do frasco de cintilação (g)} - \text{peso do frasco de cintilação vazio (g)} \times 100] / \text{peso do tecido amostra utilizada (g)}$  (LINO et al., 2018).

#### **4.11 Análise estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o Graph-Pad Prism Versão 8.0 e R. Para verificar se os dados seguiram uma distribuição normal, o teste de normalidade de cada conjunto de dados foi realizado pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. Na primeira intervenção, as comparações entre os grupos foram realizadas usando um teste t de Student bicaudal ou teste de Mann-Whitney dependendo da normalidade dos dados. O efeito da dieta e do exercício e a interação da dieta\*treinamento, da segunda intervenção, foi analisado usando ANOVA Two-Way. Quando o ANOVA foi contra-indicado, utilizamos o ANOVA-ART (*aligned rank transform*

ANOVA) (ELKIN et al., 2021). O Teste de Dunn ou Tukey (em função da normalidade dos dados) para análise *post hoc* foi realizado para avaliar as comparações múltiplas. O coeficiente de correlação de Spearman foi usado para analisar as correlações entre todas as variáveis do estudo e a interpretação foi realizada segundo Mukaka et al., (2012) (MUKAKA, 2012). O critério para significância estatística foi  $p < 0,05$  (bicaudal), utilizando-se valores de  $p$  ajustados para comparações múltiplas por False Discovery Rate. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

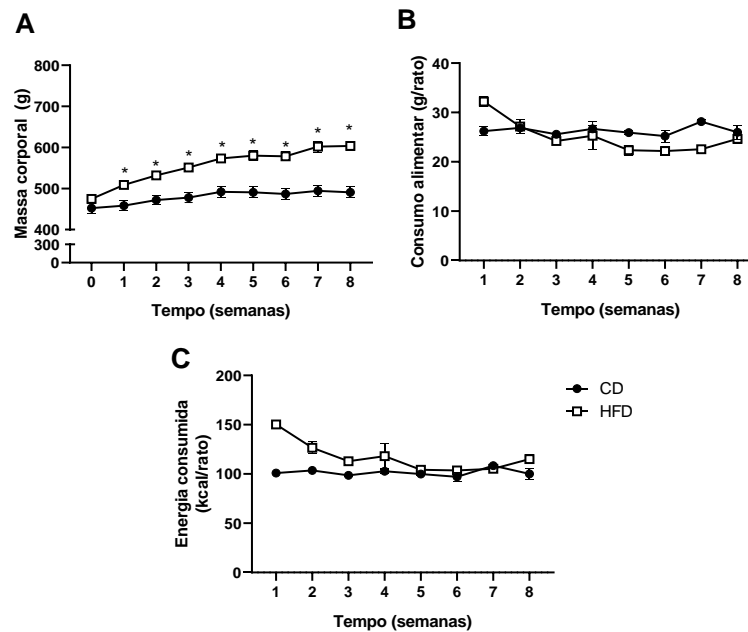
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Indução da obesidade através da dieta hiperlipídica palatável

#### 5.1.1 Evolução da massa corporal e consumo alimentar

A evolução da massa corporal é mostrada na Figura 7A. Desde a primeira semana, os animais alimentados com dieta hiperlipídica mostraram aumento da massa corporal (HFD:  $508,6 \pm 6,5$  g *versus* CD:  $458,4 \pm 11,9$  g,  $p= 0,0030$ ) em comparação aos grupos controle. A diferença aumentou progressivamente até o final do experimento. Quanto ao consumo alimentar (Figura 7B e 7C) e energia consumida, não foram observadas diferenças significativas entre os animais HFD e CD durante todo o experimento.

**Figura 7 - Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a massa corporal e no consumo alimentar durante 8 semanas.**



(A) A massa corporal de ratos *Wistar* machos foi registrado semanalmente; (B) O consumo alimentar foi registrado semanalmente; (C) A energia consumida pelos animais foi calculada segundo a densidade energética específica de cada dieta. CD: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs. CD (teste t de Student ou Mann-Whitney em função da normalidade dos dados com correção de Bonferroni). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

### 5.1.2 Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a composição corporal, adiposidade e parâmetros metabólicos

Os parâmetros de composição corporal após o período de obesidade induzida pela dieta (primeira intervenção) estão descritos na Tabela 5. Ao final de 8 semanas, um aumento de  $\pm 20\%$  na MC foi observada em animais HFD em relação ao grupo CD. Para confirmar a indução da obesidade, os parâmetros de adiposidade foram avaliados pelo DEXA. Após 8 semanas, MC, %GC, MLG, AC e MGC foram maiores no grupo HFD do que no grupo CD. Enquanto a DMO não foi diferente.

**Tabela 5 - Composição corporal dos animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 8 semanas.**

Parâmetros	CD (n=7)	HFD (n=7)	p
MC (g)	509,1 $\pm$ 13,1	613,7 $\pm$ 13,7	<0,0001*
AC (cm <sup>2</sup> )	81,47 $\pm$ 1,92	95,58 $\pm$ 1,34	<0,0001*
%GC	12,53 $\pm$ 0,71	22,47 $\pm$ 1,33	<0,0001*
MLG (g)	445,0 $\pm$ 10,6	475,4 $\pm$ 8,0	0,0417*
MGC (g)	64,0 $\pm$ 4,4	138,3 $\pm$ 10,5	<0,0001*
DMO (g/ cm <sup>2</sup> )	0,17 $\pm$ 0,00	0,17 $\pm$ 0,00	0,5553

CD: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica; MC: massa corporal; AC: área corporal; %GC: percentual de gordura corporal; MLG: massa livre de gordura; MGC: massa de gordura corporal; DMO: densidade mineral óssea. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs. CD (teste t de Student ou Mann-Whitney em função da normalidade dos dados). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Ao final de 8 semanas de dieta hiperlipídica, os depósitos do tecido adiposo foram avaliados (Tabela 6). Os compartimentos viscerais EPI, RET, MES e TAM apresentaram maior massa no grupo HFD em comparação ao CD. Enquanto o músculo gastrocnêmio foi menor quando comparado ao grupo CD. Em relação aos demais tecidos avaliados não constaram diferenças significativas em fígado, pâncreas, sóleo e EDL.

**Tabela 6 - Massa dos tecidos dos animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 8 semanas.**

Parâmetros	CD (n=7)	HFD (n=7)	p
MES (g/100 g MC)	0,71 ± 0,06	1,73 ± 0,17	0,0001*
RET (g/100 g MC)	1,00 ± 0,11	2,13 ± 0,20	0,0004*
EPI (g/100 g MC)	1,14 ± 0,11	2,40 ± 0,24	0,0006*
TAM (g/100 g MC)	0,08 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,0430*
Fígado (g/100 g MC)	2,52 ± 0,07	2,50 ± 0,13	0,9328
Pâncreas (g/100 g MC)	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,2766
Gastrocnêmio (g/100 g MC)	0,48 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,0432*
Sóleo (g/100 g MC)	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,1187
EDL (g/100 g MC)	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	>0,9999

CD: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica; MC: massa corporal; MES: tecido adiposo mesentérico; RET: tecido adiposo retroperitoneal; EPI: tecido adiposo epididimal; TAM: tecido adiposo marrom; EDL: músculo extensor longo dos dedos. Os resultados estão apresentados como média ± EPM. \* p<0,05 vs. CD (teste t de Student ou Mann-Whitney em função da normalidade dos dados). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

No que se refere aos parâmetros bioquímicos, a glicemia e o HDL registraram valores maiores no grupo dieta hiperlipídica quando comparado ao grupo controle. O CT, TG, VLDL, insulina e índice HOMA-IR não foram significativamente diferentes (Tabela 7).

**Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos dos animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 8 semanas.**

Parâmetros	CD (n=7)	HFD (n=7)	p
Glicemia (mg/dl)	100,9 ± 3,7	115,7 ± 3,2	<0,0107*
Insulina (ng/ml)	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2593
HOMA-IR	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0855
CT (mg/dl)	57,7 ± 5,7	47,7 ± 9,0	0,3683
HDL (mg/dl)	41,8 ± 7,2	69,1 ± 8,7	0,0326*
TG (mg/dl)	180,6 ± 24,2	236,2 ± 38,2	0,2423
VLDL (mg/dl)	36,7 ± 4,6	47,2 ± 7,6	0,2423

CD: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica; CT: colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina. Os resultados estão apresentados como média ± EPM. \* p<0,05 vs. CD (teste t de Student ou Mann-Whitney em função da normalidade dos dados). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Para avaliar o perfil inflamatório dos animais foi realizada a quantificação sérica de citocinas (Tabela 8). A única diferença significativa foi encontrada na irisina. Nenhuma das outras citocinas diferiram significativamente entre o grupo CD e HFD.

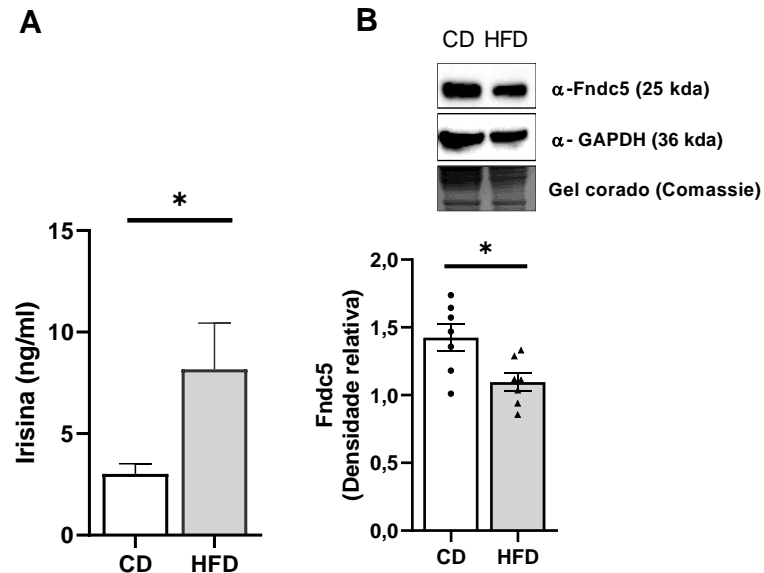
**Tabela 8- Adipocitocinas dos animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 8 semanas.**

<b>Citocinas</b>	<b>CD (n=7)</b>	<b>HFD (n=7)</b>	<b>p</b>
<b>Irisina (ng/ml)</b>	3,0 ± 0,5	8,2 ± 2,3	0,0472*
<b>IL-1β (pg/ml)</b>	209,7 ± 19,0	201,6 ± 24,2	0,6200
<b>IL-10 (pg/ml)</b>	378,0 ± 23,9	351,6 ± 60,9	0,6940
<b>TNF-α (pg/ml)</b>	988,0 ± 306,8	1008,0 ± 292,6	0,9630
<b>Leptina (pg/ml)</b>	145,8 ± 44,0	226,8 ± 74,5	0,3674

CD: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica, IL-1β: interleucina-1 beta, IL-10: interleucina-10, TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa. Os resultados estão apresentados como média ± EPM. \* p<0,05 vs. CD (teste t de Student ou Mann-Whitney em função da normalidade dos dados). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Em relação a irisina sérica (Figura 8), interessante os valores estiveram maiores no grupo HFD (8,2 ± 2,3 ng/ml) em relação ao grupo CD (3,0 ± 0,5 ng/ml) (p= 0,0472). No entanto, quando analisada a expressão proteica no gastrocnêmio, o FNDC5 apresentou menores valores no grupo HFD (1,10 ± 0,06) em relação ao grupo CD (1,42 ± 0,01) (p=0,0166).

**Figura 8 - Valores séricos de irisina e expressão proteica de FNDC5.**

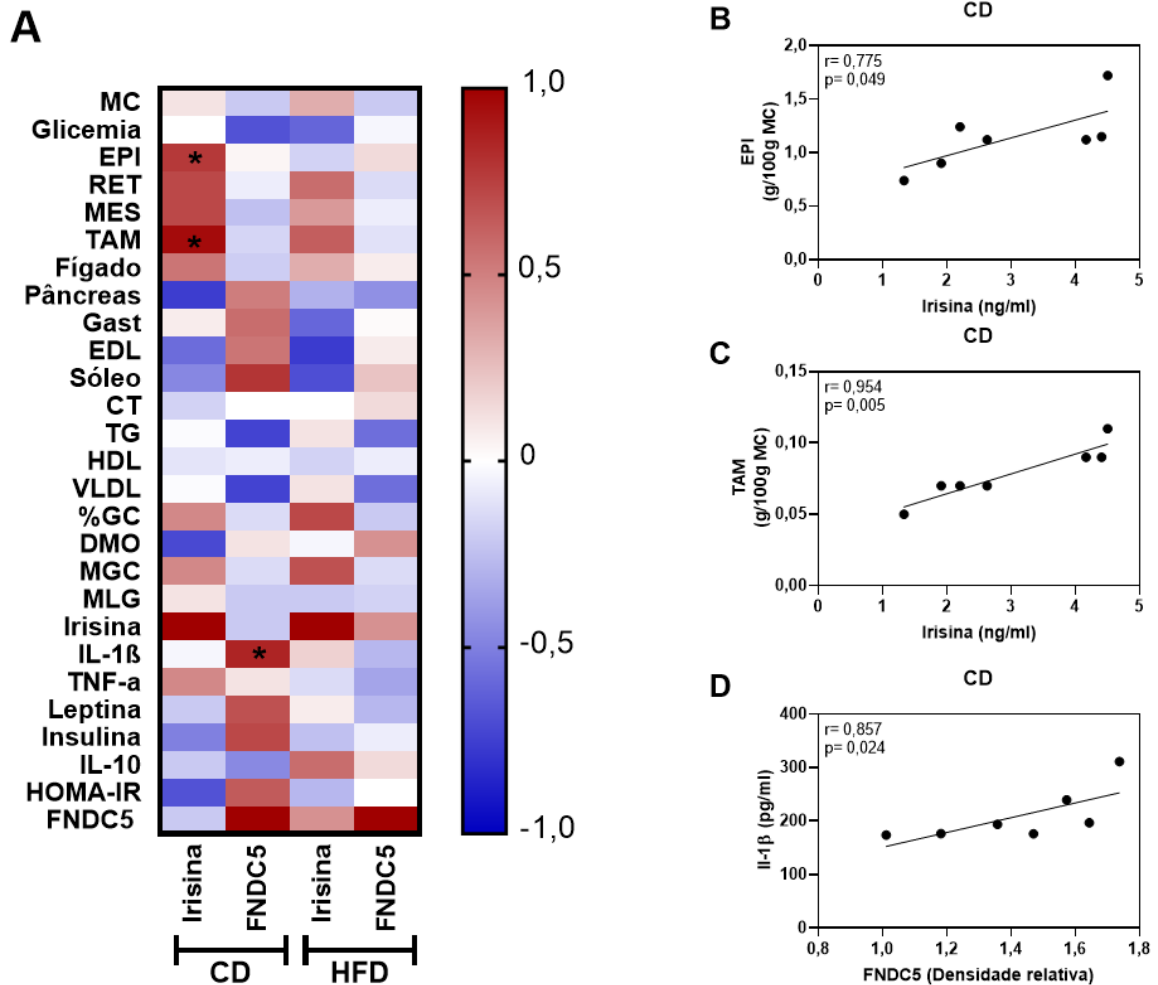


(A) Valores séricos de irisina em animais alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica por 8 semanas; (B) Expressão proteica de FNDC5 no músculo gastrocnêmio. CD: dieta controle; HFD: dieta hiperlipídica; FNDC5: fibronectina tipo III- contendo domínio 5. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs. CD (teste t de Student ou Mann-Whitney em função da normalidade dos dados). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Para verificar se houve correlação dos parâmetros metabólicos com a composição corporal dos animais, foi realizada uma matriz de correlação de Spearman entre as variáveis do estudo. A correlação entre irisina e FNDC5 está apresentada na Figura 9. Foram observadas correlações significativas apenas no grupo CD. As correlações foram positivas e fortes entre irisina e EPI ( $r = 0,775$ ,  $p = 0,049$ ); irisina e TAM ( $r = 0,954$ ,  $p = 0,005$ ) e; FNDC5 e IL-1 $\beta$  ( $r = 0,857$ ,  $p = 0,024$ ).



**Figura 9 - Correlação de Spearman entre irisina e FNDC5 e características gerais do estudo de acordo com os grupos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) e dieta padrão (CD) após 8 semanas.**



(A) Mapa de calor da correlação de Spearman entre irisina e FNDC5 e características gerais do estudo. A intensidade da cor varia de 0 (coeficiente de correlação fraco) até +1/-1 (coeficiente de correlação forte); (B) Correlação de Spearman entre irisina e tecido adiposo epididimal (EPI) no grupo dieta padrão (CD); (C) Correlação de Spearman entre irisina e tecido adiposo marrom (TAM) no grupo dieta padrão (CD); (D) Correlação de Spearman entre FNDC5 e interleucina 1-beta (IL-1β) no grupo dieta padrão (CD). MC: massa corporal; EPI: tecido adiposo epididimal; RET: tecido adiposo retroperitoneal; MES: tecido adiposo mesentérico; TAM: tecido adiposo marrom; Gast: gastrocnêmio; EDL: músculo extensor longo dos dedos; CT: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL: lipoproteína de alta densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; %GC: percentual de gordura corporal; DMO: densidade mineral óssea; MGC: massa de gordura corporal; MLG: massa livre de gordura; IL-1β: interleucina 1-beta; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; IL-10: interleucina-10; HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina; FNDC5: fibronectina tipo III- contendo domínio 5 \*A correlação de Spearman é significativa com  $p < 0,05$ .

### 5.1.3 Discussão

Nosso estudo mostrou que a dieta promoveu aumento na massa corporal, adiposidade corporal e aumento dos depósitos viscerais no grupo HFD, evidenciando o fenótipo obeso. A obesidade ainda foi acompanhada por alterações em parâmetros bioquímicos como aumento da glicose circulante e irisina sérica. Interessantemente, além do grupo HFD não manifestar sinais de dislipidemia, ainda foram observados aumentos na fração HDL e redução da expressão proteica de FNDC5 no gastrocnêmio.

Muitas pesquisas simulam uma dieta hiperlipídica de 60% para causar obesidade severa e provocar alterações metabólicas de forma mais precoce, porém foi demonstrado que 45% de gordura na dieta é suficiente para levar a alterações metabólicas que resultem na obesidade (SPEAKMAN, 2019). Ainda, o padrão de consumo de gordura na dieta de seres humanos fica em torno de 30-40%. Portanto, o uso de dietas para induzir a obesidade com mais de 40% de gordura é muito extremo em comparação com a dieta ocidental e torna difícil a reprodutibilidade em humanos (LAI; CHANDRASEKERA; BARNARD, 2014). Por outro lado, neste estudo, a dieta hiperlipídica palatável foi composta por um teor de gordura de 20%. Embora a nossa dieta tenha menor densidade energética comparada com dietas de alto teor de gordura, comprovamos aqui o fenótipo obeso após 8 semanas de indução. Esses resultados são consistentes com estudos prévios que usaram uma composição semelhante para induzir a obesidade (DUARTE et al., 2008; ESTADELLA et al., 2004; OISHI et al., 2018; SENE-FIORESE et al., 2008). Após seis semanas de dieta hiperlipídica, os animais manifestaram um quadro de inflamação crônica de baixo grau e disfunção endotelial, aumentando os riscos para doenças cardiovasculares (OISHI et al., 2018). Outros dados, ainda mostraram que independentemente do aumento de massa corporal, os depósitos viscerais e a taxa de lipogênese de adipócitos foram aumentados após oito semanas de dieta hiperlipídica (DUARTE et al., 2008; ESTADELLA et al., 2004; SENE-FIORESE et al., 2008).

A combinação de níveis elevados de gordura e açúcar tornam os alimentos densos em energia mais palatáveis, mascarando seu alto teor de gordura (DREWNOWSKI et al., 2012; GOMEZ-SMITH et al., 2016). Nesse sentido, em modelos experimentais, o equivalente mais próximo da dieta alimentar ultraprocessada humana é a dieta cafeteria que possui alimentos variados com diferentes valores nutricionais, com alta densidade energética e de alta palatabilidade,

mimetizando as características obesogênicas da dieta humana (GOMEZ-SMITH et al., 2016; LEIGH; KENDIG; MORRIS, 2019). Evidências recentes sugerem que a dieta hiperlipídica leva à hiperfagia, aumento na frequência das refeições e na ingestão de energia devido à palatabilidade da dieta (LEIGH; KENDIG; MORRIS, 2019; LICHOLAI et al., 2018; SULEIMAN; MOHAMED; BAKAR, 2020). A hiperfagia decorrente da palatabilidade da dieta é resultante da alteração na regulação central que afeta o padrão de comportamento, incluindo neurotransmissores e hormônios específicos (CARLIN et al., 2016; FORDHAL; LOCKE; JONES, 2016). No entanto, nossos dados mostraram que o grupo HFD durante todo o experimento apresentaram consumo similar ao grupo CD. De acordo com os resultados presentes, Gao, Ma e Liu (2015) mostraram que embora não tenham visto alteração no consumo entre os grupos, relatou que os animais alimentados com HFD aumentaram a massa corporal de forma independente da ingestão alimentar, semelhante à nossa observação. Uma possível explicação para esses achados é que a dieta rica em lipídeos quando comparada a dieta padrão alcança um nível mais alto de eficiência energética que reprime a capacidade oxidativa mitocondrial no fígado e no músculo esquelético levando o corpo a manter a homeostase, reduzindo o consumo alimentar (DÍAZ-URBINA et al., 2018; GAO; MA; LIU, 2015). Ademais, é importante ressaltar que o aumento da ingestão energética ainda intensifica os sinais de saciedade reduzindo progressivamente a ingestão alimentar como forma de prevenir o acentuado ganho de peso (DÍAZ-URBINA et al., 2018).

A exposição prolongada a dietas com alto teor lipídico induz a um aumento da massa corporal em torno de 10% a 20% em relação aos controles (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007). Nosso estudo confirma observações anteriores, e nossos animais HFD apresentaram um aumento de 20% na massa corporal quando comparados aos animais CD. Esse incremento foi observado em estudos anteriores a partir de 2 semanas de introdução de HFD e o fenótipo se tornou mais expressivo, após 4 semanas de HFD (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007). Nossos animais alimentados com HFD evidenciaram aumento na massa corporal já na primeira semana de introdução da dieta e permaneceu elevada durante todo o experimento. Ao final das 8 semanas de indução da obesidade, o aumento significativo foi de 80g no grupo HFD. O aumento de massa corporal no entanto, nem sempre foi observado em todos os estudos (DUARTE et al., 2008; ESTADELLA et al., 2004; HIGA et al., 2014; LACERDA et al., 2018; MESSA et al., 2020; SENE-FIORESE et al., 2008). A massa corporal e o IMC não são a melhor forma de acessar a composição corporal, uma vez que não refletem de forma acurada a

quantidade de gordura visceral. Deste modo, o acesso a composição corporal, gordura total, massa corporal através do DEXA tem sido utilizados como padrão ouro (PARENTE, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1995, definiu como obeso, indivíduos com o percentual de gordura maior do que 25% (WHO, 1995). De forma elegante, Ho-Pam, Campbell e Nguyen (2011) discutiram que na verdade 22% de gordura corresponde ao valor de IMC definido para obesidade (HO-PHAM; CAMPBELL; NGUYEN, 2011). Nesse estudo, nossos animais apresentaram 22% de percentual de gordura se aproximando do valor definido pela (OMS) e por Ho-Pam, Campbell e Nguyen (2011). Estudos consistentes apresentaram um aumento na massa de gordura e percentual de gordura em animais induzidos a HFD (LACERDA et al., 2018; VANGOITSENHOVEN et al., 2018). Uma dieta de 49% de gordura, após 24 semanas, promoveu um aumento de ~31% de gordura em ratos *Wistar* e 26% em animais controle, mensurados pelo DEXA (LU et al., 2016). Os achados são diferentes do encontrado no nosso estudo, no entanto podemos atribuir que o percentual de gordura foi mais do que o dobro ofertado em nossa dieta e ao tempo de exposição a dieta. Ademais, nos achados de Lu et al. (2016) os animais HFD apresentaram ~194 g de massa de gordura corporal *versus* ~176 g nos animais controle, superior aos achados do nosso estudo. De Wilde et al. (2010) mostraram que camundongos C57BL/6J induzidos a 8 semanas de obesidade com uma dieta de 45% de gordura resultou em 33% de gordura corporal em animais controles e 44% em animais HFD. Embora o valor esteja muito superior aos valores encontrados em nosso estudo, a diferença de em torno de 10% (DE WILDE et al., 2010) entre animais controles e obesos também foi observada em nossos animais.

O percentual de gordura e a massa de gordura são importantes indicadores para comprovar o fenótipo obeso em animais e humanos, no entanto não refletem de forma acurada a distribuição regional de gordura. Já é conhecido na literatura que a localização anatômica de gordura é determinante nas consequências da obesidade, especialmente a adiposidade visceral é responsável pelas principais alterações negativas associadas a obesidade (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Para confirmar se a alteração dos indicadores paramétricos e da composição corporal acompanhou a elevação da adiposidade visceral nos animais, foi avaliado o peso dos depósitos de gorduras viscerais. Dados anteriores do nosso grupo, observaram aumento nos mesmos depósitos viscerais epididimal, mesentérico e retroperitoneal em ratos *Wistar* após 6 semanas de dieta HFD

(OISHI et al., 2018), após 12 semanas em ratos Sprague-Dawley (GOMEZ-SMITH et al., 2016), e em ratos Holtzman (SPERETTA et al., 2018).

Nessa perspectiva estudos que utilizaram uma dieta hiperlipídica com composição diferente da nossa também evidenciaram semelhantes resultados. Lacerda et al. (2018) observaram expansão do visceral e perigonadal após 12 semanas de dieta e Vangoitsenhoven et al. (2018), observaram aumento nos depósitos epididimais em relação ao subcutâneo após 14 semanas de HFD. Corroborando com os estudos anteriores, nossos animais mostraram valores de massa mais elevadas em todos os depósitos viscerais. Dentre esses, o EPI mostrou maior massa quando comparado ao RET e MES. Isso pode ser a consequência de que em roedores, os triglicérides são estocados preferencialmente na região epididimal, ao contrário, de seres humanos que estocam TG na região omental (SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). Essa diferença é significativa, uma vez que o tecido adiposo mesentérico é o depósito mais análogo ao tecido adiposo abdominal de seres humanos pois tem acesso à veia porta (CHUSYD et al., 2016). Ainda assim o acúmulo de gordura em depósitos epididimais também induz a alterações metabólicas associadas a obesidade (CHUSYD et al., 2016).

Ainda em relação ao tecido adiposo, nosso estudo observou aumento do TAM nos animais HFD. Esse achado também foi relatado por Sene-Fiorese et al. (2008) e Duarte et al. (2008) que associaram a condição de excesso de nutrientes. De maneira geral, o TAM é inversamente correlacionado a IMC e massa corporal, ademais, aparece com atividade e massa reduzida em indivíduos obesos (VIJGEN et al., 2011; WANG et al., 2015). Isso acontece, pois, o excesso de nutrientes ofertados pela dieta hiperlipídica, promove um balanço energético positivo que supre as demandas de energia do organismo, inibindo dessa forma a função do TAM. Portanto, esperávamos encontrar o TAM reduzido no grupo HFD. No entanto, um estudo clássico conduzido por Rothwell e Stock em 1979 demonstraram que ratos expostos a longo prazo a "dieta de cafeteria" tiveram um aumento exacerbado no gasto energético, confirmando um aumento na massa de tecido adiposo marrom em comparação com ratos controle (ROTHWELL; STOCK, 1979).

A avaliação da composição corporal é importante na obesidade porque reduzidos valores de massa muscular podem ocultar uma grande quantidade de tecido adiposo e trazer prejuízos ao metabolismo (JENSEN et al., 2019). Dessa forma avaliamos inicialmente a massa livre de gordura que é composta em sua maioria por músculo esquelético, seguido de não esquelético, órgãos, tecido

conjuntivo e osso (PRADO; HEYMSFIELD, 2014) a fim de evidenciar alterações na massa dos tecidos. Nossos dados mostraram que a massa livre de gordura esteve elevada no grupo HFD em comparação ao grupo CD, corroborando com estudos anteriores (VANGOITSENHOVEN et al., 2018). É descrito na literatura que indivíduos obesos podem apresentar mais massa muscular e força muscular máxima devido à sobrecarga mecânica imposta em membros inferiores. No entanto, quando controlada a variável massa de gordura, indivíduos obesos possuem menos força em relação a eutróficos (TALLIS; JAMES; SEEBACHER, 2018). Não avaliamos a força muscular nesse estudo, por não ser um dos objetivos dessa pesquisa, porém acreditamos que a avaliação da força muscular poderia ser um importante indicativo para caracterizar esse processo de obesidade e massa muscular e, portanto, é uma sugestão para futuros estudos.

Para saber se algum grupo muscular específico foi responsável pelo aumento da massa livre de gordura, avaliamos a massa do gastrocnêmio, sóleo e EDL. Não foram observadas diferenças no sóleo e EDL. No entanto o músculo gastrocnêmio esteve elevado em animais alimentados com dieta padrão. Resultados anteriores mostraram elevação na massa do sóleo e EDL em camundongos alimentados por 16 semanas com ~ 63% de gordura, que foi acompanhado por níveis elevados de lipídeos intramiocelular. Reforçando a ideia de que em excesso ocorre armazenamento de ácidos graxos em depósitos não-adiposos, como no músculo (MESSA et al., 2020). Ainda, os autores destacaram que a massa muscular é associada a idade, e esse aumento somente foi detectado apenas após 16 semanas de dieta hiperlipídica, mas não após 8 semanas. Nossos dados corroboram com esses achados, pois mostramos que apenas 8 semanas de dieta hiperlipídica em ratos jovens adultos não alteraram a massa do sóleo e EDL. Adicionalmente, nossos dados evidenciaram uma redução na massa do músculo gastrocnêmio em animais alimentados com dieta hiperlipídica. A literatura que versa sobre essa associação, mostra que a obesidade pode promover um acúmulo intermuscular de triglicerídeos, reduzir a massa muscular e afetar a força e a potência ao alterar o tipo de fibra muscular e a sinalização do cálcio para função contrátil (TALLIS; JAMES; SEEBACHER, 2018). Não fizemos análise histológica do músculo esquelético nesse estudo, mas pontuamos aqui que clinicamente, o acúmulo de triglicerídeos intramuscular e subfascicular estão associados ao desenvolvimento de resistência insulínica (DI MEO; IOSSA; VENDITTI, 2017; MORO; BAJPEYI; SMITH, 2008). Portanto, a redução do gastrocnêmio nos nossos achados, podem também sugerir um ambiente favorável para a redução da sensibilidade à insulina pelos tecidos. Em conjunto, esses dados sugerem que a elevação da

massa livre de gordura pode ser associada a outros tecidos musculares, além dos avaliados nesse estudo.

Nesse sentido, o consumo de dieta hiperlipídica ao longo do tempo, promove um aumento de gordura acometendo órgãos com importante função fisiológica (EBBERT; JENSEN, 2013; FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010). Dessa forma avaliamos tecidos específicos dos animais que poderiam sofrer alterações frente ao consumo de dieta hiperlipídica. No fígado, o acúmulo excessivo de lipídeos provoca esteatose hepática e causa o aumento na expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 o que pode levar à fibrogênese hepática; ainda o aumento do tecido adiposo reduz os níveis de adiponectina circulantes, que por sua vez, aumentam a lipotoxicidade e morte das células hepáticas (KANDA et al., 2018; MANNE; SAAB, 2014; QURESHI; ABRAMS, 2007). Ainda no fígado, o acúmulo ectópico de gordura no fígado resulta em uma redução na oxidação de ácidos graxos mitocondriais tem sido fortemente associado à resistência à insulina (GRUBEN et al., 2014). No pâncreas, o acúmulo intracelular de triglicerídeos associado ao estado pró-inflamatório da obesidade, leva a disfunção das células  $\beta$ , resultando em redução da secreção de insulina com consequentemente hiperglicemia (SAKAI; TAYLOR; CHOUHAN, 2018). Além disso, as concentrações crônicas elevadas de glicemia eventualmente podem levar a apoptose de células  $\beta$  (TOMITA, 2016). No entanto no presente estudo, não foi evidenciada diferença entre a massa dos tecidos do fígado e do pâncreas entre os animais do grupo CD e HFD.

No entanto, ao avaliar os parâmetros bioquímicos, a glicemia, mostrou aumento dos níveis circulantes no grupo HFD. Apesar disso, no grupo HFD, não foi observado aumento nas concentrações séricas de insulina, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou no índice HOMA-IR, possível indicativo de um início de resistência insulínica ou falha no funcionamento de células  $\beta$ . A literatura mostra que durante a obesidade o aumento da liberação de ácidos graxos ou a deposição ectópica em órgãos não-adiposos está associada a uma redução na captação de glicose em tecidos periféricos devido ao aumento da resistência insulínica por esses tecidos, prejudicando o metabolismo da glicose (GUILHERME et al., 2008). Higa et al. (2014) verificaram hiperglicemia, intolerância à glicose e hiperinsulinemia a partir da terceira semana de dieta hiperlipídica (35% de gordura); Gao, Ma e Liu (2015) evidenciaram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica mostraram intolerância à glicose, resistência insulínica e hiperglicemia, e que por sua vez, desencadearam a

hipertrofia das ilhotas pancreáticas mimetizando o início da patogênese da DM2; e após 14 semanas de dieta hiperlipídica foi verificado um aumento da glicemia e hiperinsulinemia (VANGOITSENHOVEN et al., 2018). Os resultados concordam parcialmente, com a maioria dos estudos da literatura, uma vez que observamos hiperglicemia após a indução da obesidade, porém não foi evidenciada redução da sensibilidade à insulina. Entretanto esses estudos utilizaram um maior teor de gordura na dieta hiperlipídica, o que pode explicar a diferença de resultados. Ademais, mecanismos clássicos têm elucidado a secreção das citocinas inflamatórias com o quadro de resistência insulínica. Dados publicados mostraram que a infusão de TNF- $\alpha$  em adipócitos induz à resistência à insulina através do aumento da fosforilação em serina do IRS-1 (HOTAMISLIGIL et al., 1996). Acreditamos que as 8 semanas de dieta hiperlipídica não foram suficientes para promover a instalação de um quadro clínico compatível com a resistência insulínica, no entanto a manifestação persistente de glicemia aumentada pode indicar um início de prejuízo no seu metabolismo, induzindo a um futuro surgimento da resistência insulínica.

A presença de resistência insulínica favorece o início da dislipidemia na maioria dos indivíduos obesos (FRANSSEN et al., 2011). O principal efeito da insulina no tecido adiposo é a redução da lipólise e estímulo da síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis nos tecidos, aumentando a captação de triglicerídeos do sangue para o tecido adiposo (DIMITRIADIS et al., 2011). Esse processo é manifestado especialmente pela redução nas partículas de HDL, níveis aumentados de triglicerídeos, e elevação de VLDL (GRUNDY, 2004; KLOP; ELTE; CABEZAS, 2013). No entanto, estudos que utilizaram a mesma dieta mostraram que existe uma tendência para elevação de triglicerídeos (DUARTE et al., 2008; SENE-FIORESE et al., 2008) e colesterol total (SENE-FIORESE et al., 2008) em animais alimentados por dieta hiperlipídica por 8 semanas. Corroborando os achados obtidos com a nossa dieta, os animais alimentados com dieta hiperlipídica desse estudo não mostraram elevados níveis de triglicerídeos e colesterol total, mas foi observada uma tendência para esse aumento.

Interessantemente, foi notado um aumento significativo de HDL nos animais HFD. Dados do nosso grupo de estudo que utilizaram a mesma dieta, evidenciaram o mesmo resultado (DUARTE et al., 2008; ESTADELLA et al., 2004; SPERETTA et al., 2018) e que contrasta com os estudos da literatura (GRUNDY, 2004; KLOP; ELTE; CABEZAS, 2013). Esse aumento pode ser explicado pois a gordura da dieta aumenta o transporte reverso de colesterol como um processo



adaptativo as alterações metabólicas provocadas pela dieta hiperlipídica, mas acreditamos que esse efeito seja transitório (ROLLAND; BROOM, 2011). Ainda podemos associar elevados níveis de HDL a presença do elevado teor de vitamina E contido na dieta hiperlipídica. A vitamina E tem sido descrita como potencial tratamento da obesidade e síndrome metabólica por produzir resultados positivos em partículas aterogênicas, efeitos antioxidantes e melhoria no perfil lipídico (WONG et al., 2017). Em estudos anteriores a suplementação de vitamina E na dieta hiperlipídica resultou em aumento na fração HDL do colesterol de ratos *Wistar* que receberam durante 30 dias 440 IU.kg<sup>-1</sup> de vitamina E (ALMEIDA et al., 2012), e após 8 semanas de dieta hiperlipídica suplementada com vitamina E (JEON et al., 2005).

Como brevemente mencionado, o papel do sistema imune na obesidade é fundamental para compreender a patofisiologia da obesidade. As citocinas inflamatórias controlam diversos processos fisiológicos que se associam as comorbidades manifestadas no indivíduo obeso. Dessa forma, TNF- $\alpha$  (GOYAL et al., 2012; SANTOS et al., 2019) e IL-1 $\beta$  (FAIN, 2006; KOENEN et al., 2011; PALOMERA et al., 2018; SHODA et al., 2017) se encontram elevadas na obesidade. Já a citocina anti-inflamatória IL-10 não foi alterada entre controles e obesos (SERRANO et al., 2020; TAM et al., 2010).

A expressão pancreática de IL-1 $\beta$  é induzida em altas concentrações de glicose, especialmente nas situações de obesidade. Essa citocina tem efeito citotóxico levando ao comprometimento da secreção de insulina, diminuição da proliferação celular e apoptose das células beta pancreáticas (MAEDLER et al., 2002). Diferentemente dos achados anteriores, verificamos nesse estudo que a IL-1 $\beta$  não foi diferente entre grupos HFD e CD após a indução da obesidade. Santos et al. (2019), também não encontraram diferenças entre a circulação séria de IL-1 $\beta$ / mRNA *IL-1 $\beta$*  em animais alimentados por 6 semanas com HFD e controle (SANTOS et al., 2019). Acreditamos que a não alteração da IL-1 $\beta$  possa ser justificada pois o tempo oferecido de dieta hiperlipídica não foi suficiente para a instalação de um quadro inflamatório e trouxe alterações discretas na glicemia. Ainda, no grupo dieta padrão, a análise das correlações estatísticas mostrou uma forte correlação positiva entre IL-1 $\beta$  e FNDC5. Esses resultados são inesperados uma vez que a irisina parece reduzir as demais citocinas inflamatórias. Já foi previamente observado que em astrócitos, a irisina regula de forma negativa a secreção de IL-1 $\beta$  (WANG et al., 2018). Outros achados também destacaram o potencial anti-inflamatório do FNDC5 sobre a inflamação do tecido

adiposo (XIONG et al., 2015). Isso pode ocorrer porque a irisina ativa a via AMPK, que por sua vez reduz a inflamação e a polarização de macrófagos M1 (XIONG et al., 2018). Embora tenhamos observado a correlação entre IL-1 $\beta$  e FNDC5, é fundamental ressaltar que essa correlação só é positiva e significativa em animais alimentados com dieta padrão e não foi observada a mesma correlação no grupo alimentado com dieta hiperlipídica.

O TNF- $\alpha$  é uma das principais citocinas produzidas pelo tecido adiposo. No tecido adiposo a TNF- $\alpha$  pode modificar a expressão de diferentes adipocinas e regular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-1 (CAWTHORN; SETHI, 2008). Inicialmente, os estudos mostraram que células expostas a elevadas concentrações de TNF- $\alpha$  evidenciaram resistência à ação da insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1994a) e quando o receptor de TNF- $\alpha$  foi bloqueado, houve recuperação da sinalização insulínica (HOTAMISLIGIL et al., 1994b). Desde então, acredita-se no papel do TNF- $\alpha$  em regular o metabolismo glicídico. Goyal et al. (2012) observou que o TNF- $\alpha$  tem correlação positiva com glicose plasmática e, estão aumentados em diabéticos, especialmente em indivíduos diabéticos e obesos (GOYAL et al., 2012). Ainda, na obesidade foram encontrados níveis mais elevados do TNF- $\alpha$  transmembranar em adipócitos (KATSUKI et al., 1998; TZANAVARI; GIANNOGONAS; KARALIS, 2010) sendo que o aumento se inicia após 6 semanas de dieta hiperlipídica, aumentando progressivamente até 24 semanas (OISHI et al., 2018). No entanto, no nosso estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Devido ao comportamento das outras citocinas, acreditávamos que o TNF- $\alpha$  não estaria elevado, uma vez que funciona como uma citocina capaz de regular a expressão de outras proteínas inflamatórias. Outra possível explicação é o fato de que os níveis elevados de TNF- $\alpha$  tem sido correlacionado com DM2 ou resistência insulínica. Nesse sentido, nossos animais apresentaram apenas a manifestação de glicemia elevada, no entanto os níveis de insulina não estiveram alterados e não foi evidenciado prejuízo na sensibilidade da insulina.

Estudos anteriores já mostraram que a IL-10 atuou de forma positiva na sinalização insulínica em adipócitos suprimindo a expressão do TNF- $\alpha$  (STOLARCZYK, 2017), suprimindo a inflamação local e a ação deletéria de citocinas pró-inflamatórias no músculo esquelético (DAGDEVIREN et al., 2016). Ainda já foi proposto que frente a perfil metabólico desfavorável são encontrados valores elevados de IL-10 no tecido adiposo provavelmente por um mecanismo compensatório (FEBBRAIO, 2014), mas nem sempre essa relação foi comprovada. No nosso

estudo, a IL-10, citocina anti-inflamatória também não mostrou diferenças significativas entre os grupos CD e HFD, corroborando com achados anteriores (SERRANO et al., 2020; TAM et al., 2010). Uma possível explicação reside no fato de que nossos animais não estavam em estado de resistência à ação da insulina ou dislipidemia, o que pode explicar a não alteração da IL-10. Isso porque achados anteriores mostraram que a IL-10 em obesos mórbidos apresentou forte correlação com um estado sistêmico de hiperinsulinemia e resistência à insulina (LEON-CABRERA et al., 2015).

Da mesma forma, a leptina não esteve elevada em animais obesos. Sugerimos que as 8 semanas de dieta hiperlipídica não foram suficientes para provocar aumento na expressão da leptina. Como o principal local de produção da leptina é o tecido adiposo branco e a expressão é aumentada de forma proporcional a massa de gordura, era esperado encontrar a adipocitocina elevada em animais HFD (EKMEN et al., 2016; HARIRI; THIBAUT, 2010; ZHANG et al., 1994). Portanto, acreditamos que a expansão dos adipócitos viscerais foi insuficiente para promover o aumento da secreção de leptina e instalar o quadro de resistência a leptina, um dos principais fatores de contribuição para o seu aumento (GRUZDEVA et al., 2019; WOODS et al., 2000). Ainda, recentemente a expressão do TNF- $\alpha$  mostrou reduzir a expressão de leptina conforme demonstrado recentemente no *crosstalk* entre adipocinas (JIANG et al., 2019). Uma vez que o TNF- $\alpha$  não mostrou diferenças significativas no nosso estudo, as concentrações de leptina também não.

Dentre as miocinas secretadas pelo músculo esquelético, a irisina promove correções fisiológicas e de adaptações ao treino. No entanto, a exposição prolongada a uma dieta rica em gordura parece ser um fator importante na secreção de irisina. Ainda não existe um consenso na literatura sobre os achados. Nos seres humanos, a irisina está altamente e positivamente relacionada ao índice de massa corporal, massa corporal e gordura corporal (CRUJEIRAS et al., 2014; DE MENECK et al., 2018; LÖFFLER et al., 2015; PARDO et al., 2014; STENGEL et al., 2013). No entanto em roedores, diversos efeitos foram reportados. Quiñones et al. (2015) mostraram que ratos Sprague-Dawley que receberam dieta hiperlipídica por 10 semanas não apresentaram nenhuma diferença significativa nos níveis de irisina quando comparados aos controles (QUIÑONES et al., 2015). Kang et al. (2019) mostraram que os ratos Sprague-Dawley que receberam dieta hiperlipídica por 16 semanas apresentaram uma redução nos níveis de irisina no final do

experimento. Os mesmos resultados foram relatados por Lu et al. (2016) após 24 semanas e Yang et al. (2015) em camundongos C57BL/6J (YANG et al., 2015). Nestes animais, a redução provavelmente ocorreu devido ao FNDC5 adiposo, uma vez que as concentrações de irisina no músculo esquelético permaneceram inalteradas. Associações positivas entre irisina e obesidade foram demonstradas por Guilford et al. (2017) que relataram que o mRNA *Fndc5* no tecido adiposo era significativamente maior no HFD em comparação com os seus controles. E foram reforçados por Kazeminasab et al. (2018) que observaram a maior secreção de irisina em camundongos obesos em comparação a camundongos não obesos após 8 semanas de dieta hiperlipídica. Neste estudo, semelhante à evidência mais recente, observamos que após 8 semanas da introdução da dieta hiperlipídica, o grupo obeso apresentou aumento na secreção de irisina. Esta observação apoia a teoria de que a irisina desempenha um papel compensatório durante distúrbios metabólicos, como obesidade, comprometimento da homeostase da glicose e resistência insulínica (GUILFORD et al., 2017; ROCA-RIVADA et al., 2013). É importante destacar que os valores séricos de irisina que estiveram reduzidos no grupo alimentado com dieta padrão, pode ser devida a redução do tecido adiposo epididimal e do tecido adiposo marrom, uma vez que foi observada uma correlação positiva forte da irisina com estes tecidos, mas os mesmos achados não foram reportados no grupo alimentado com dieta hiperlipídica.

Por outro lado, de forma contrária aos valores de irisina, a expressão de FNDC5 no músculo gastrocnêmio, se mostrou significativamente elevada no grupo dieta padrão. Embora os achados mostrem que a maior expressão de FNDC5 ocorre através do músculo (em condições fisiológicas ou patológicas) já foi relatado que a irisina é secretada em parte pelo tecido adiposo visceral em animais obesos (FRÜHBECK et al., 2020; KIRAT et al., 2021). Isso sugere que a origem do FNDC5 que elevou os valores de irisina circulante em animais obesos, possam ser de origem adiposa nos animais obesos que possuem maior adiposidade visceral. No entanto não avaliamos essa expressão. Ainda, podemos associar os baixos valores de FNDC5 dos animais obesos a redução da massa do gastrocnêmio. Já foram reportados baixos níveis de irisina circulantes em indivíduos com perda de força muscular e atrofia (CHANG et al., 2017). É importante destacar que achados recentes mostraram que há uma interação significativa entre o genótipo FNDC5 e o estado de sarcopenia em pacientes com doença hepática não alcoólica (GAO et al., 2020). Nesse sentido a irisina é um potencial biomarcador para disfunção muscular e pode auxiliar no diagnóstico precoce de sarcopenia e alterações musculares associadas a idade (CHANG

et al., 2017). Embora os valores de irisina sérica não corroborem com tais achados, a redução na expressão proteica de FNDC5 na musculatura de animais alimentados com dieta hiperlipídica, pode ser um importante indicativo precoce para obesidade sarcopênica, uma vez que o músculo gastrocnêmio teve a massa reduzida nesses animais.

Nesse sentido, a sarcopenia consiste em um dos processos negativos resultantes da obesidade. Nessa mesma linha, a complexidade entre a obesidade e o metabolismo ósseo pode estar relacionada a rarefação óssea. Esses dados têm gerado muitos achados conflitantes. De acordo com a literatura clássica, a obesidade causa aumento na densidade mineral óssea ao ativar positivamente a carga mecânica levando à inibição dos osteoclastos, associados a liberação de fatores químicos estimuladores da proliferação de osteoblastos. Essa remodelação óssea resulta no aumento na densidade mineral óssea (CAO, 2011). No entanto, recentes achados mostram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica promove reabsorção óssea significativa e pode aumentar a infiltração lipídica no tecido ósseo levando a secreção de fatores inflamatórios que promovem a osteoclastogênese e suprimindo da osteoblastogênese (FAIENZA et al., 2019). Nos nossos achados não observamos alteração na densidade mineral óssea do grupo HFD em comparação ao grupo CD. Sugerimos que esse tempo de exposição embora tenha aumentado a adiposidade visceral, talvez tenha sido insuficiente para induzir alterações no tecido ósseo.

Os resultados desta investigação reforçaram a dieta hiperlipídica palatável como eficiente para induzir a obesidade em modelos animais, independentemente da quantidade de ingesta alimentar. O modelo reforçou que os parâmetros de adiposidade são bons instrumentos na avaliação da adiposidade visceral, confirmada através da expansão de adipócitos viscerais. Metabolicamente foram confirmados o aumento da glicose e irisina sérica frente a prolongada exposição a dieta hiperlipídica. Portanto, sugerimos que a irisina seja um biomarcador precoce e indicador metabólico a ser avaliado e considerado como parte das alterações decorrentes da obesidade, além do FNDC5 também poder ser um marcador precoce para obesidade sarcopênica em animais obesos. No entanto ainda são necessários mais estudos para confirmar esses achados. A nossa dieta hiperlipídica não promoveu a instalação compatível com o fenótipo inflamatório apresentado por indivíduos obesos, o que pode sugerir que as 8 semanas sejam insuficientes para provocar a inflamação sistêmica crônica de baixo grau, embora o quadro de obesidade tenha sido instalado, ressaltando o caráter crônico da doença.

## 5.2 Efeitos do treinamento físico e da intervenção dietética em modelos animais induzidos a obesidade

### 5.2.1 Protocolo de teste máximo

As variáveis de treinamento são apresentadas na Tabela 9. A capacidade máxima de exercício obtida através da  $V_{\text{máx}}$  no início do protocolo de treinamento foi significativamente diferente entre os grupos HFD-Ex e CD-Ex. Após 4 semanas de intervenção a capacidade de treinamento foi maior quando comparados ao pré-treino, mostrando uma melhora dessa variável, mas não houve diferença entre os grupos HFD-Ex e CD-Ex. Ao final do treinamento, a capacidade foi maior quando comparados ao pré-treino, mas não houve diferença entre os grupos HFD-Ex e CD-Ex. Foi observado similar comportamento no tempo e distância percorrida.

**Tabela 9- Protocolo de teste máximo**

	Pré-treino		4 semanas		8 semanas	
	HFD-Ex	CD-Ex	HFD-Ex	CD-Ex	HFD-Ex	CD-Ex
$V_{\text{máx}}(\text{m/min})$	25,7±0,6 <sup>a</sup>	21,5±0,3	30,6±0,7 <sup>b</sup>	30,1±1,0 <sup>b</sup>	33,1±0,6 <sup>b</sup>	34,8±1,1 <sup>b,c</sup>
$\Delta t$ (min)	19,6±0,8 <sup>a</sup>	15,6±0,6	26,9±0,5 <sup>a,b</sup>	26,0±1,1 <sup>b</sup>	29,3±0,6 <sup>b</sup>	30,7±0,9 <sup>b,c</sup>
$\Delta s$ (m)	508,0±30,0 <sup>a</sup>	337,7±16,1	825,2±31,2 <sup>b</sup>	798,9±64,0 <sup>b</sup>	972,6±36,6 <sup>b</sup>	1076,0±65,8 <sup>b,c</sup>

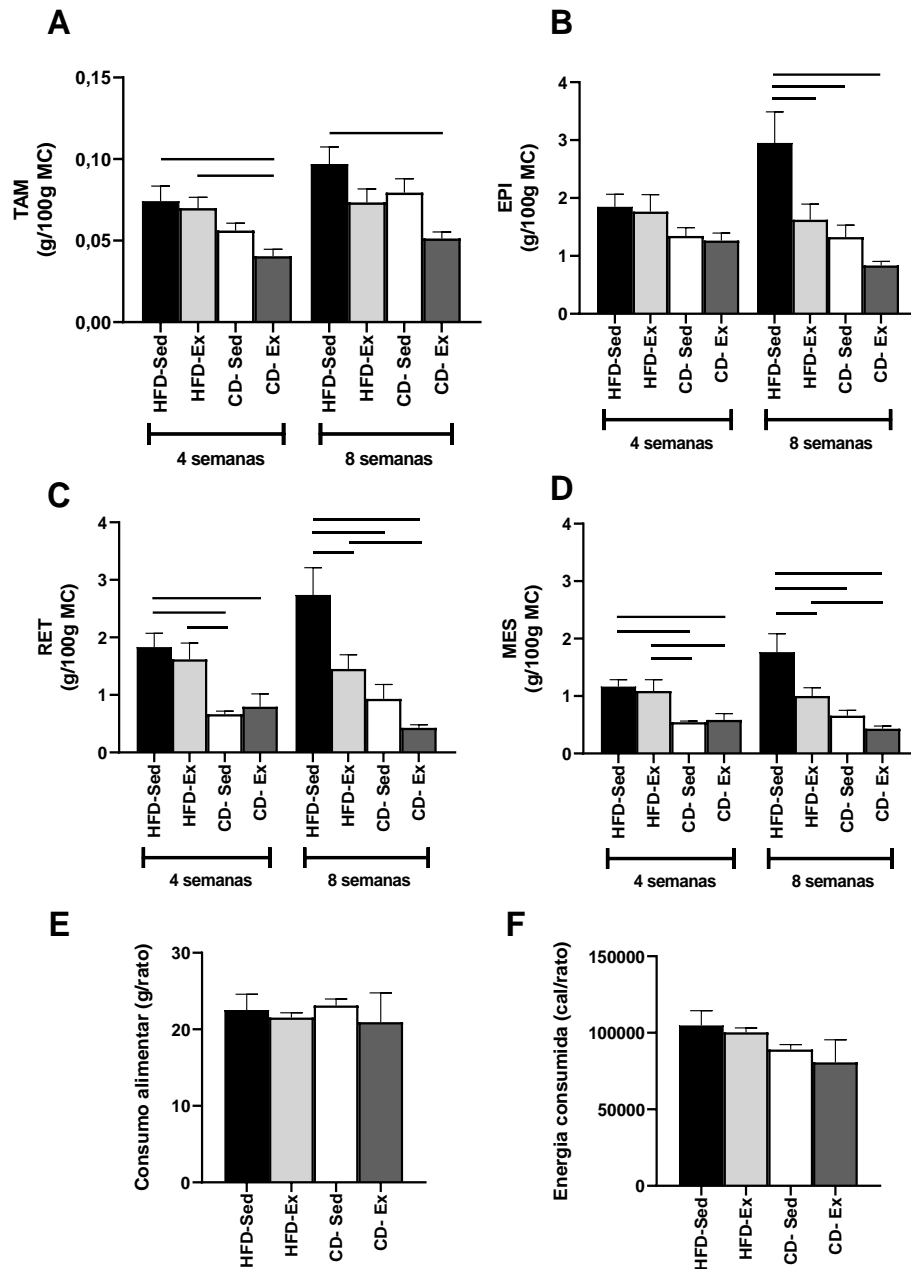
HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado.  $V_{\text{máx}}$ : velocidade máxima;  $\Delta t$ : tempo decorrido;  $\Delta s$ : distância percorrida. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  EPM.  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> vs. CD-Ex na mesma semana; <sup>b</sup> vs. pré-treino no mesmo grupo; <sup>c</sup> vs. semana 4 no mesmo grupo. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

### 5.2.2 Efeitos do treinamento físico e da intervenção dietética

Para acessar os compartimentos do tecido adiposo, diferentes tecidos foram coletados, como evidenciado na Figura 10. Na quarta semana observamos que o grupo CD-Ex ( $0,04 \pm 0,00$  g/100 g MC) registrou os menores valores de TAM, quando comparados ao HFD-Ex ( $0,07 \pm 0,00$  g/100 g MC) e ao HFD-Sed ( $0,07 \pm 0,00$  g/100 g MC). Na oitava semana o grupo CD-Ex ( $0,05 \pm 0,00$  g/100 g MC) exibiu o mesmo comportamento, mas foi diferente apenas de HFD-Sed ( $0,10 \pm 0,01$  g/100 g MC). Os depósitos de gordura visceral também foram avaliados durante o protocolo experimental, conforme representado na Figura 10B, 10C e 10D. Observamos uma resposta semelhante dos depósitos RET e MES às intervenções de dieta e treinamento. Na quarta semana, os grupos CD mostraram menores valores de RET e MES em comparação com os grupos HFD.

No final da 8ª semana, o CD-Ex, CD-Sed e HFD-Ex apresentaram menores valores de RET e MES em comparação ao grupo HFD-Sed. Como mostrado na Figura 10B, não foram encontradas diferenças na massa de tecido EPI após 4 semanas de intervenção. Porém após 8 semanas, o grupo HFD-Ex e os dois grupos CD apresentaram uma redução em relação ao HFD-Sed ( $2,95 \pm 0,54$  g/100 g MC).

**Figura 10 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício nos depósitos do tecido adiposo e consumo alimentar.**



(A) Tecido adiposo marrom (TAM) de ratos Wistar machos; (B) Tecido adiposo epididimal (EPI) de ratos Wistar machos; (C) Tecido adiposo retroperitoneal (RET) de ratos Wistar machos; (D) Tecido adiposo mesentérico (MES) de ratos Wistar machos, (E) Média do consumo alimentar durante todo o experimento, (F) Média do consumo energético durante todo o experimento. MC: massa corporal; HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. As barras representam as diferenças significativas entre os grupos indicados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $p < 0,05$ ). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

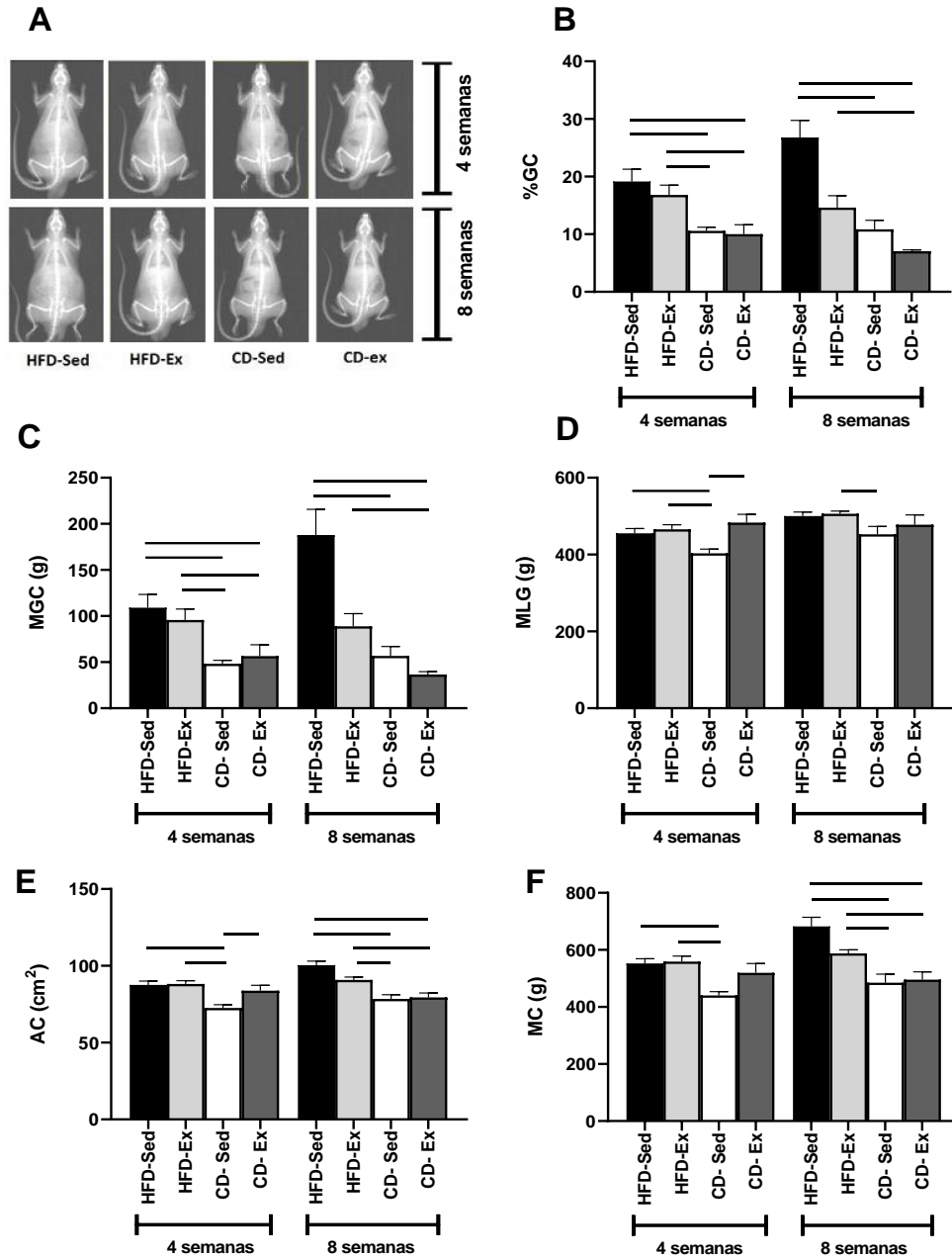


Na quarta semana houve efeito da dieta isolada ( $p < 0,001$ ) no TAM e na oitava semana houve efeito da dieta e do exercício de forma isolada ( $p < 0,05$ ). Como esperado, na quarta semana houve efeito da dieta ( $p < 0,05$ ) na massa dos depósitos EPI, RET e MES, no entanto não foi observado efeito do exercício. Interessantemente, na oitava semana a dieta ( $p < 0,001$ ) e o exercício ( $p < 0,001$ ) estiveram associados com as massas dos depósitos EPI, RET e MES, no entanto a interação dieta e exercício não foi significativa.

O consumo alimentar e energético também foi avaliado durante todo o período e são apresentados na Figura 10 E-F, sem diferenças significativas em ambos.

Para determinar os efeitos da dieta e do exercício na adiposidade, o %GC e a MGC (Figura 11B e C) foram avaliados pelo DEXA e apresentaram uma resposta semelhante. Após 4 semanas, CD-Sed e CD-Ex apresentaram menor %GC e MGC do que o HFD-Ex e o HFD-Sed. Ao final do experimento (8 semanas), o CD-Ex e o CD-Sed permaneceram com valores reduzidos em relação ao grupo HFD-Sed (%GC:  $26,73 \pm 3,00\%$ ; MGC:  $187,6 \pm 28,16$  g,  $p < 0,05$ ). Os efeitos a curto prazo das intervenções na MLG (4 semanas) (Figura 11D) mostraram que os menores valores foram observados no grupo CD-Sed ( $403,30 \pm 10,81$  g) em comparação aos grupos HFD-Ex, HFD-Sed e CD-Ex. Ao final do experimento, a única diferença foi observada no grupo CD-Sed em relação ao grupo CD-Ex. A AC também foi avaliada através do DEXA, como mostrado na Figura 11E. Após 4 semanas, o CD-Sed ( $73,27 \pm 1,74$  cm<sup>2</sup>) registrou a menores valores de AC entre todos os grupos, sendo significativamente diferente do HFD-Sed, HFD-Ex e CD-Ex. No entanto após 8 semanas, os grupos HFD-Sed e HFD-Ex registraram a maiores valores de AC em comparação aos grupos CD-Sed e CD-Ex.

Figura 11 - Efeitos da intervenção dietética e exercício na composição corporal.



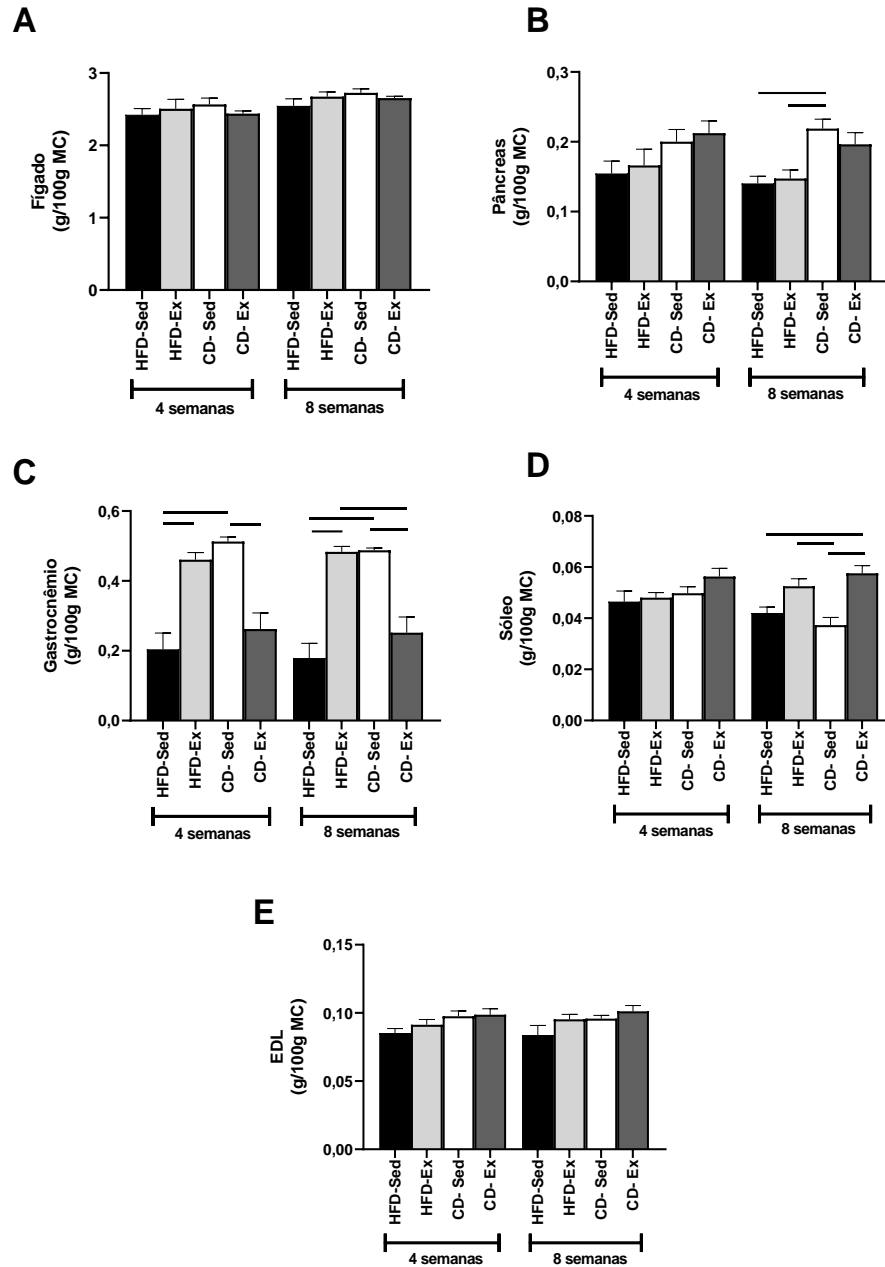
(A) Imagens do DEXA dos grupos dieta após 4 e 8 semanas de intervenção; (B) O percentual de gordura corporal (%GC) de ratos Wistar machos foi determinada após 4 e 8 semanas; (C) A massa de gordura (MGC) foi determinada nas semanas 4 e 8; (D) A massa livre de gordura (MLG) foi registrada a cada 4 semanas; (E) A área corporal (AC) foi determinada em 4 e 8 semanas; (F) A massa corporal (MC) foi registrada a cada 4 semanas. HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. As barras representam as diferenças significativas entre os grupos indicados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $p < 0,05$ ). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Como mostrado na Figura 11F, no início da primeira intervenção (4 semanas), os animais do grupo CD-Sed ( $440,6 \pm 13,15$  g,  $p < 0,001$ ) apresentaram MC reduzida quando comparados aos grupos HFD. No entanto, após 8 semanas, foi observada uma diferença significativa nos dois grupos CD quando comparados aos dois grupos HFD.

Houve efeito apenas da dieta ( $p < 0,001$ ) na quarta semana no %GC e MGC. No entanto na oitava semana houve efeito isolado da dieta ( $p < 0,001$ ) e do exercício ( $p < 0,001$ ) e ainda da interação dieta e exercício sobre o %GC e MGC ( $p < 0,05$ ). O exercício de forma isolada ( $p < 0,001$ ) influenciou a MLG apenas após 4 semanas, não houve efeito das intervenções após 8 semanas. Houve efeito isolado da dieta ( $p < 0,001$ ) e do exercício ( $p < 0,05$ ) após 4 semanas na AC e, exclusivamente da dieta ( $p < 0,001$ ) após 8 semanas. Em relação a MC, houve efeito isolado da dieta ( $p < 0,001$ ) após 4 e 8 semanas de intervenções e, da interação dieta e exercício sobre a MC apenas após 8 semanas ( $p < 0,05$ ).

Dentre os tecidos não adiposos avaliados nesse estudo, o fígado (Figura 12 A) e o EDL (Figura 12 E) não sofreram alterações frente as intervenções. O pâncreas apresentou diferenças apenas após 8 semanas. O grupo CD-Sed ( $0,22 \pm 0,01$  g/100 g MC) registrou os maiores valores da semana, sendo significativamente diferentes dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica. Após 4 semanas, o músculo gastrocnêmio (Figura 12 C) esteve elevado nos grupos HFD-Ex e CD-Sed em relação aos grupos HFD-Sed e CD-Ex/HFD-Sed respectivamente. Após 8 semanas, os mesmos resultados foram repetidos e o grupo HFD-Sed apresentou menor massa de gastrocnêmio em relação ao grupo HFD-Ex e CD-Sed e, o grupo CD-Ex teve a massa de gastrocnêmio menor quando comparados aos grupos CD-Sed e HFD-Ex. Em relação ao sóleo, alterações foram observadas somente após 8 semanas. O grupo CD-Ex ( $0,06 \pm 0,00$  g/100 g MC) apresentou a maior massa do sóleo quando comparado aos grupos HFD-Sed e CD-Sed. Já o grupo HFD-Ex ( $0,05 \pm 0,00$  g/100 g MC) mostrou valores elevados do sóleo em relação ao CD-Sed. Não houve efeito de nenhuma das intervenções no fígado e sóleo após as 4 semanas. Porém foi observado efeito da dieta no pâncreas e EDL ( $p < 0,05$ ) e, da interação dieta e exercício no gastrocnêmio ( $p < 0,001$ ) após 4 e 8 semanas. Ainda, após 8 semanas houve efeito da dieta ( $p < 0,001$ ) no pâncreas e do exercício no sóleo ( $p < 0,001$ ).

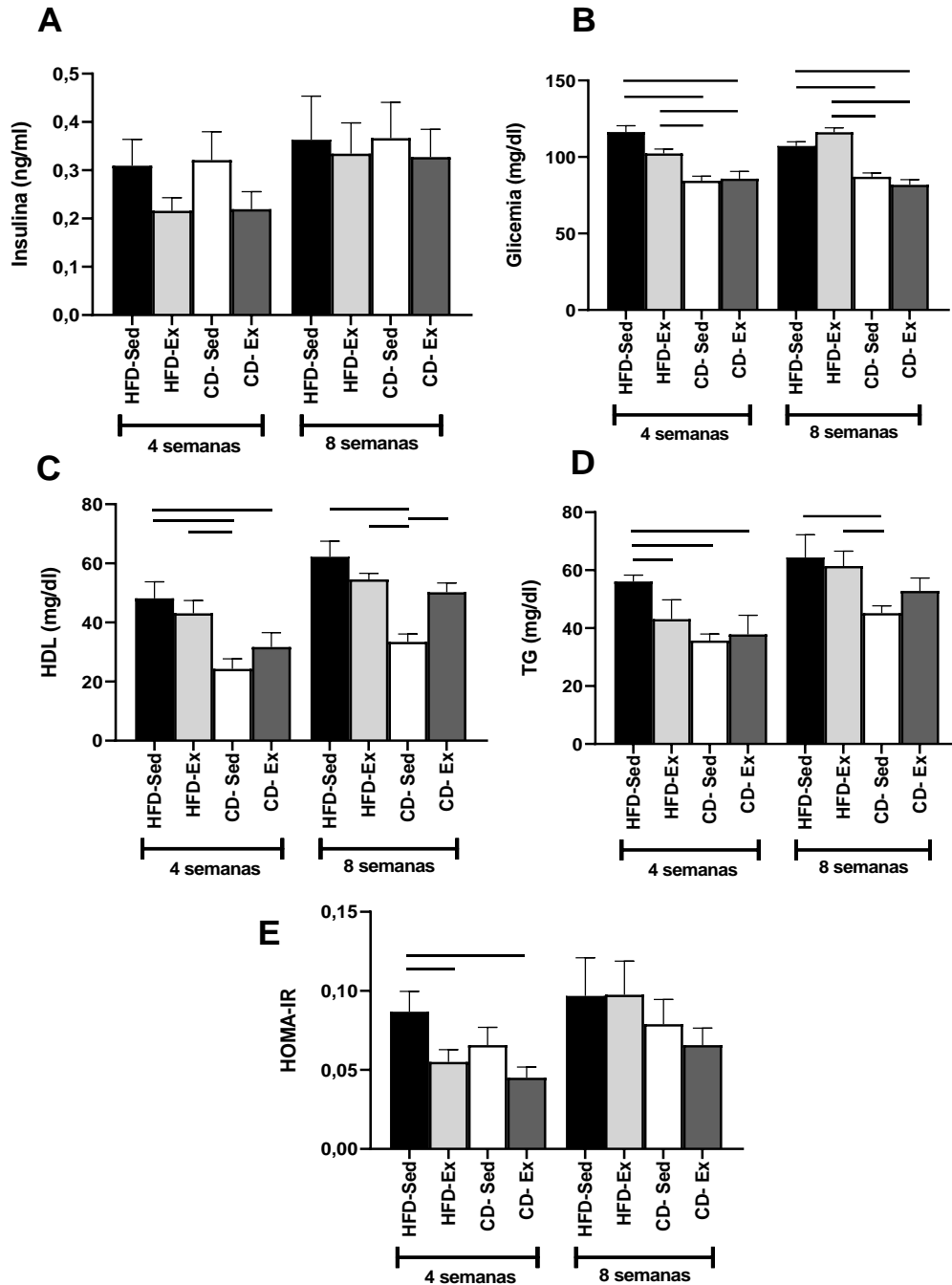
**Figura 12 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício sobre os compartimentos do músculo esquelético, fígado e pâncreas.**



(A) Fígado de ratos *Wistar* machos após 4 e 8 semanas de intervenção; (B) Pâncreas de ratos *Wistar* machos após 4 e 8 semanas de intervenção; (C) Gastrocnêmio de ratos *Wistar* machos após 4 e 8 semanas de intervenção; (D) Sóleo de ratos *Wistar* machos após 4 e 8 semanas de intervenção; (E): Músculo de extensor longo dos dedos (EDL) de ratos *Wistar* machos após 4 e 8 semanas de intervenção. HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário; MC: massa corporal. As barras representam as diferenças significativas entre os grupos indicados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $p < 0,05$ ). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

O perfil glicêmico e lipídico dos animais também foi avaliado nesse estudo (Figura 13). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de insulina entre os grupos após 4 e 8 semanas (Figura 13A). Ambos os grupos dieta controle apresentaram redução significativa na glicemia em relação aos grupos dieta hiperlipídica após 4 e 8 semanas de intervenção (Figura 13 B). Avaliamos ainda o índice HOMA-IR entre os grupos. Observamos que as diferenças significativas apareceram somente após as 4 semanas de intervenção. O grupo HFD-Sed ( $0,09 \pm 0,01$ ) apresentou valores mais elevados quando comparado aos grupos CD-Ex e HFD-Ex.

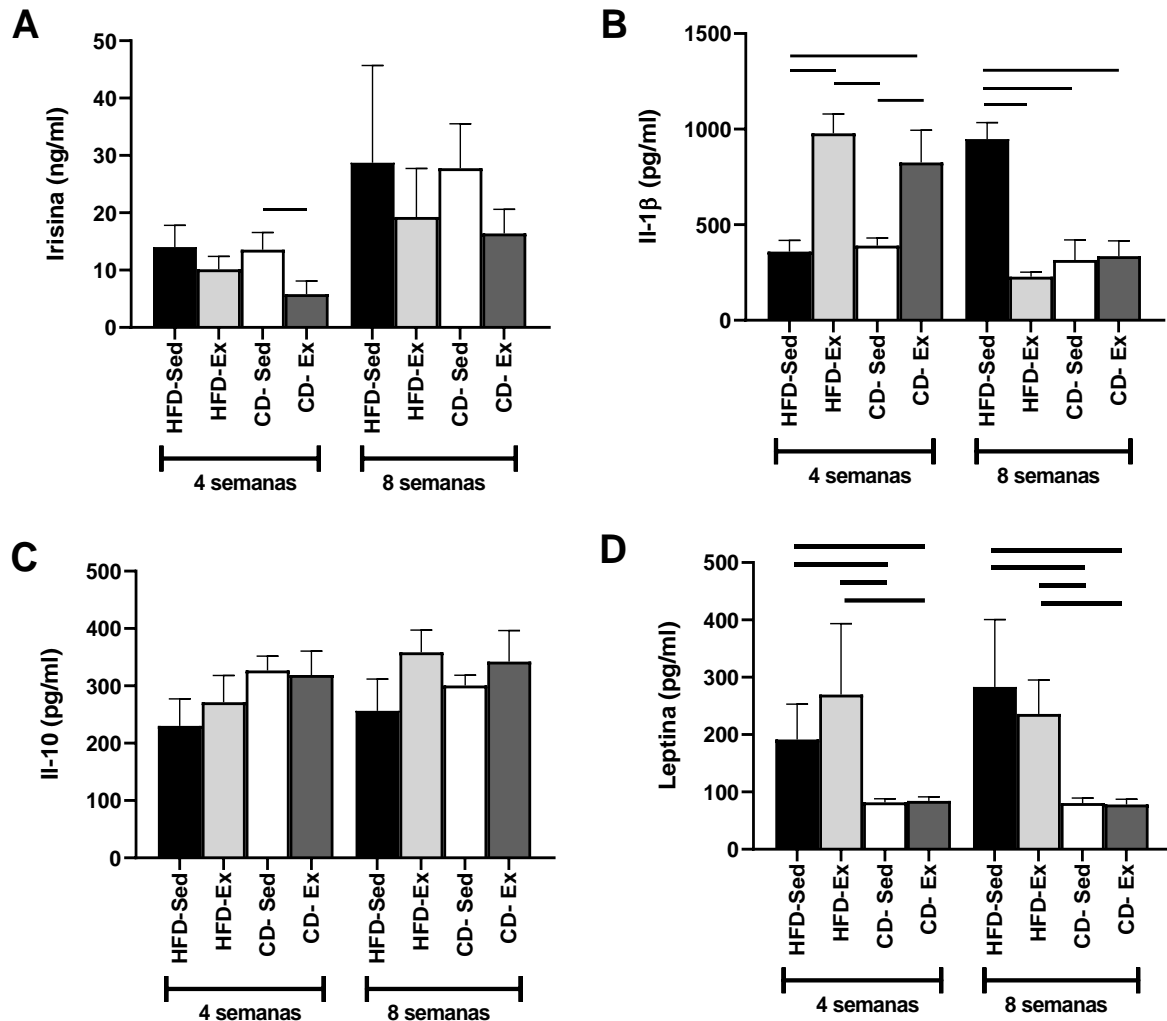
Figura 13 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício sobre o perfil glicêmico e lipídico.



(A) Concentração de insulina sérica após 4 e 8 semanas de intervenções dietéticas e de treinamento; (B) Glicose plasmática foi avaliada a cada 4 semanas; (C) Níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL); (D) Níveis séricos de triglicerídeos (TG) foram determinados após 4 e 8 semanas; (E): Índice HOMA-IR de 4 a 8 semanas de intervenções dietéticas e de treinamento. HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. As barras representam as diferenças significativas entre os grupos indicados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $p < 0,05$ ). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Em relação as frações lipídicas, os níveis de TG (Figura 13D) estiveram aumentaram nos grupos HFD após 4 e 8 semanas de intervenção. O grupo HFD-Sed ( $56,11 \pm 2,22$  mg/dl) apresentou os maiores valores na quarta semana, em relação aos grupos HFD-Ex, CD-Sed e CD-Ex. Já na oitava semana, o grupo CD-Sed ( $45,14 \pm 2,55$  mg/dl) apresentou os menores valores sendo significativamente diferentes dos grupos HFD-Sed e HFD-Ex. Em relação a fração HDL (Figura 13 C), na quarta semana, foi observado que os animais CD-Sed ( $24,31 \pm 3,38$  mg/dl) registraram os menores valores, sendo significativamente diferentes de HFD-Ex e HFD-Sed. O grupo CD-Ex ( $31,71 \pm 4,87$  mg/dl) também mostrou redução dos valores em relação ao grupo HFD-Sed, mas não diferiu do grupo HFD-Ex. Após 8 semanas, a resposta do HDL foi similar a resposta da quarta semana, o grupo CD-Sed ( $33,42 \pm 2,70$  mg/dl) mostrou valores mais reduzidos em relação aos animais dos grupos HFD-Sed, HFD-Ex e CD-Ex. Houve efeito do exercício na insulina ( $p < 0,05$ ) apenas após 4 semanas. A dieta de forma isolada teve efeito na glicemia após 4 e 8 semanas ( $p < 0,001$ ). Houve efeito da dieta no TG ( $p < 0,001$ ) após 4 e 8 semanas e ainda da interação dieta e exercício ( $p < 0,05$ ) após 4 semanas. Houve efeito da dieta no HDL ( $p < 0,001$ ) após 4 e 8 semanas e ainda da interação dieta e exercício ( $p < 0,001$ ) após 8 semanas. Foi observado efeito do exercício ( $p < 0,05$ ) no HOMA-IR após 4 semanas e nenhuma interação foi observada após 8 semanas.

**Figura 14 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício sobre os níveis séricos de adipocitocinas.**



(A) Concentração de irisina sérica após 4 e 8 semanas de intervenções dietéticas e de treinamento; (B) Interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) foi avaliada a cada 4 semanas; (C) Níveis de interleucina-10 (IL-10) foi determinada após 4 e 8 semanas; (D) Níveis séricos de leptina após 4 e 8 semanas. HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. As barras representam as diferenças significativas entre os grupos indicados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $p < 0,05$ ). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Alterações na irisina foram observadas somente após 4 semanas de intervenção, mas apenas nos grupos CD (Figura 14A). O grupo CD-Sed ( $13,57 \pm 3,00$  ng/ml) registrou maiores valores que o grupo CD-Ex ( $5,81 \pm 2,30$  ng/ml), que registrou as menores concentrações séricas. Curiosamente, após 8 semanas não houve diferenças significativas entre os grupos.

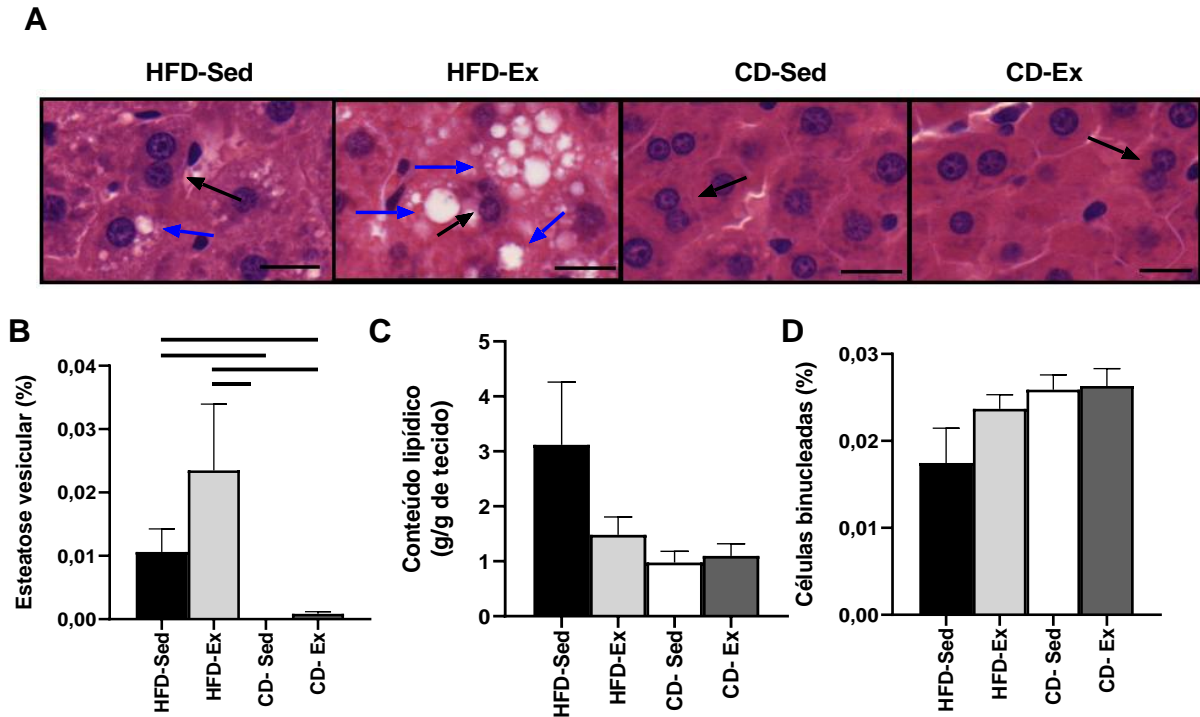


Os valores séricos de IL-1 $\beta$  foram determinadas por ELISA (Figura 14 B). Interessantemente 4 semanas após a intervenção, foram observados valores reduzidos da citocina no grupo HFD-Sed ( $359,3 \pm 58,5$  pg/ml), quando comparados aos grupos HFD-Ex e CD-Ex. Ademais o grupo CD-Sed ( $391,0 \pm 39,6$  pg/ml) também apresentou redução da IL-1 $\beta$  quando comparados aos grupos HFD-Ex e CD-Ex (Figura 14 B). No entanto, na semana 8, os animais do grupo HFD-Sed ( $948,2 \pm 85,6$  pg/ml) registraram os maiores valores quando comparado aos demais grupos. Os valores de IL-10 (Figura 14 C), mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos após as 4 e 8 semanas de intervenção. Nas semanas iniciais (4 semanas) e após as 8 semanas de intervenção os valores de leptina apresentaram comportamento idêntico. Ambos os grupos dieta controle apresentaram redução significativa na leptina sérica em relação aos grupos dieta hiperlipídica após 4 e 8 semanas de intervenção (Figura 14 D).

Não houve efeito de nenhuma intervenção na irisina e IL-10 após 4 e 8 semanas. Houve efeito do exercício ( $p < 0,001$ ) na IL-1 $\beta$  apenas após 4 semanas e, da dieta ( $p < 0,001$ ) e exercício ( $p < 0,001$ ) de forma exclusiva e da interação ( $p < 0,001$ ) após 8 semanas. Apenas a dieta ( $p < 0,001$ ) de forma isolada teve efeito na leptina após 4 e 8 semanas ( $p < 0,001$ ).

Para verificar a deposição ectópica de lipídeos no tecido hepático, foi realizada a análise da fotomicrografia (Figura 15). Frente as imagens de tecido hepático ficam evidente a presença elevada de gorduras lipídicas no tecido hepático do grupo HFD-Ex que registrou os valores mais elevados ( $0,02 \pm 0,01\%$ ) em relação aos grupos CD-Sed e CD-Ex. Esses dados foram comprovados pelo aumento total das gotículas de gordura determinada através da histologia. Os valores também estiveram aumentados no grupo HFD-Sed ( $0,01 \pm 0,00\%$ ) em relação a ambos os grupos alimentados com dieta padrão. O conteúdo lipídico determinado por gravimetria e as células binucleadas não apresentaram diferenças entre os grupos. Houve efeito apenas da dieta ( $p < 0,05$ ) na esteatose vesicular.

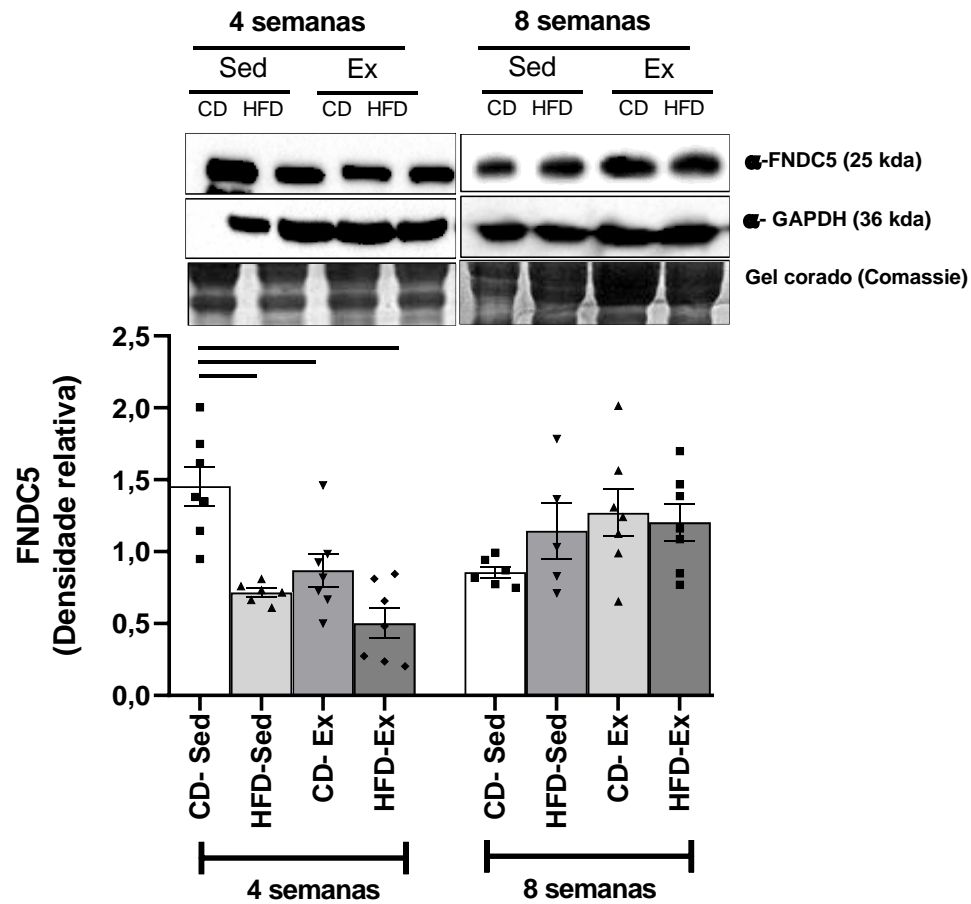
**Figura 15 – Fotomicrografia e morfometria do tecido hepático após 8 semanas de intervenção dietética e exercício.**



(A) Imagens das gotículas lipídicas e células binucleadas do tecido hepático na magnitude de 40x (50 $\mu$ m). As setas azuis indicam as microvesículas de gordura e as setas pretas indicam as células binucleadas. (B) Porcentagem das vesículas de gordura nos grupos após 8 semanas de intervenção; (C) Determinação do conteúdo de lipídeos do tecido hepático; (D) Porcentagem das células binucleadas nos grupos após 8 semanas de intervenção. HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. As barras representam as diferenças significativas entre os grupos indicados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $p < 0,05$ ). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

A expressão proteica foi avaliada no músculo gastrocnêmio após 4 e 8 semanas de intervenção dietética e treinamento (Figura 16). Já em 4 semanas, foi observada uma redução significativa apenas em animais controles. Após 4 semanas, valores mais elevados foram observados no grupo CD-Sed ( $1,45 \pm 0,14$ ) em relação a todos os demais grupos HFD-Sed, HFD-Ex e CD-Ex. Não foram observadas diferenças significativas após 8 semanas de intervenção. Houve efeito da dieta ( $p < 0,001$ ) e exercício ( $p < 0,001$ ) de forma isolada na expressão de FNDC5 apenas após 4 semanas.

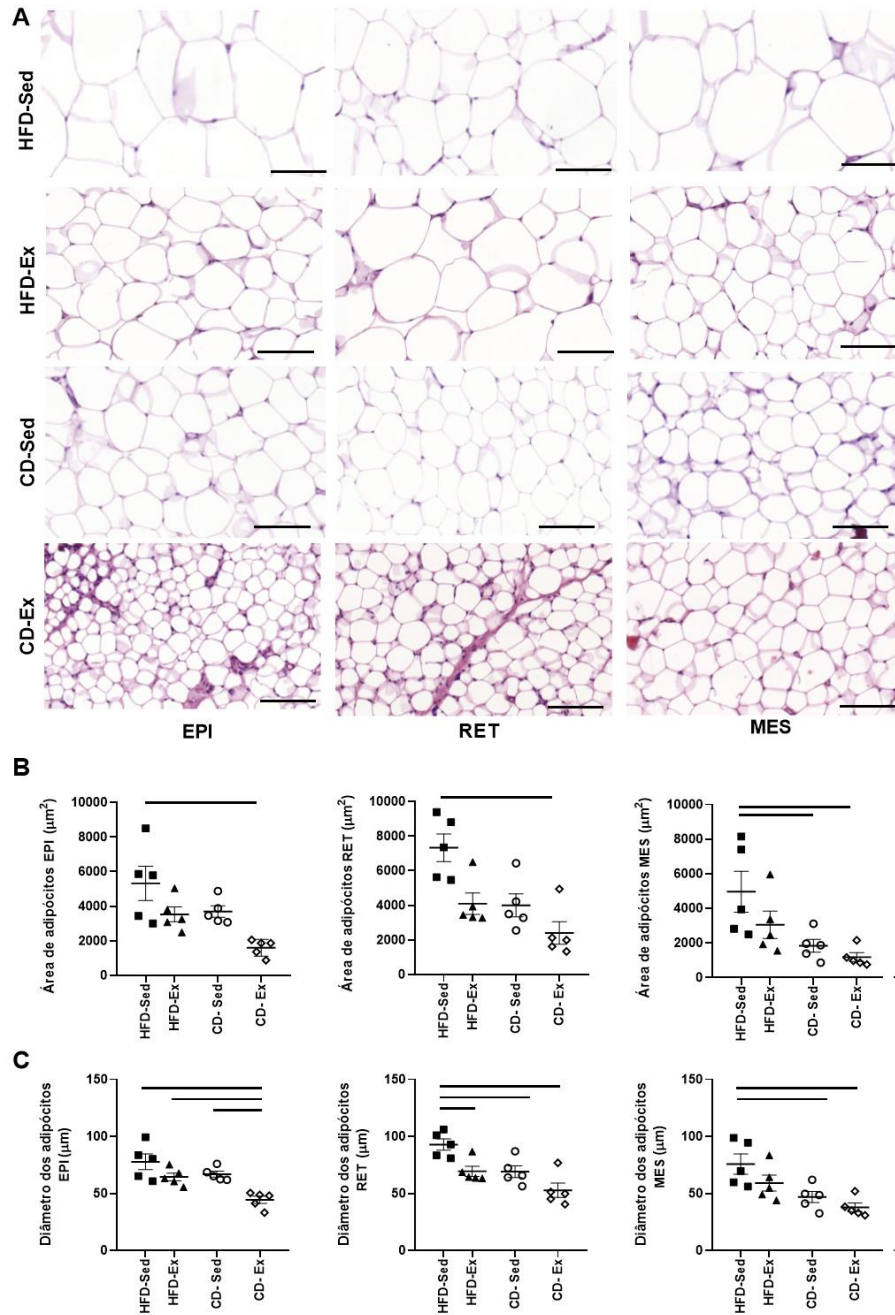
**Figura 16 - Efeitos da intervenção dietética e do exercício sobre a expressão de FNDC5 no músculo gastrocnêmio.**



Imagens representativas de imunotransferência mostrando a proteína A presença de uma banda de 25 kDa foi detectada no gastrocnêmio com anticorpos anti-FNDC5 após as 4 semanas de intervenção dietética e treinamento; GAPDH foi usado como controle endógeno. HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário; FNDC5: fibronectina tipo III- contendo domínio 5. As barras representam as diferenças significativas entre os grupos indicados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $p < 0,05$ ). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

A morfometria dos depósitos viscerais também foi analisada após 8 semanas de intervenção (Figura 17). A área dos adipócitos viscerais EPI e RET responderam de forma similar as intervenções. O menor registro de área foi observado nos animais do grupo CD-Ex (EPI:  $1607,00 \pm 215,50 \mu\text{m}^2$ ; RET:  $2408,00 \pm 650,30 \mu\text{m}^2$ ) em relação ao grupo HFD-Sed, que teve os maiores valores de área (EPI:  $5321,00 \pm 988,60 \mu\text{m}^2$ ; RET:  $7330,00 \pm 798,8 \mu\text{m}^2$ ). O tecido MES mostrou uma resposta similar, e os menores valores de área foram observados nos grupos CD-Ex e CD-Sed em relação ao grupo HFD-Sed ( $4963,00 \pm 1180,00 \mu\text{m}^2$ ).

**Figura 17 - Fotomicrografia e morfometria do tecido adiposo após 8 semanas de intervenção dietética e exercício.**



(A) Imagens representativas do tecido adiposo mostrando a coloração enzimática hematoxilina e eosina usando microscopia de campo claro, objetiva de 20x (100 $\mu\text{m}$ ); (B) Área dos adipócitos EPI, RET e MES; (C) Diâmetro dos adipócitos EPI, RET e MES. EPI: tecido adiposo epididimal; RET: tecido adiposo retroperitoneal; MES: tecido adiposo mesentérico. HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. As barras representam as diferenças significativas entre os grupos indicados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $p < 0,05$ ). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Em relação ao diâmetro dos adipócitos (Figura 17C), foi observado um comportamento similar nos depósitos RET e MES. Os menores valores de diâmetro do EPI foram observados nos animais CD-Ex ( $44,49 \pm 3,19 \mu\text{m}$ ) em relação a todos os demais grupos. No RET os maiores valores de diâmetro foram observados nos animais HFD-Sed ( $92,95 \pm 4,84 \mu\text{m}$ ) em relação a todos os grupos. No tecido MES o maior registro do diâmetro foi observado nos animais os grupos HFD-Sed ( $75,81 \pm 8,83 \mu\text{m}$ ) em relação aos grupos alimentados com dieta padrão.

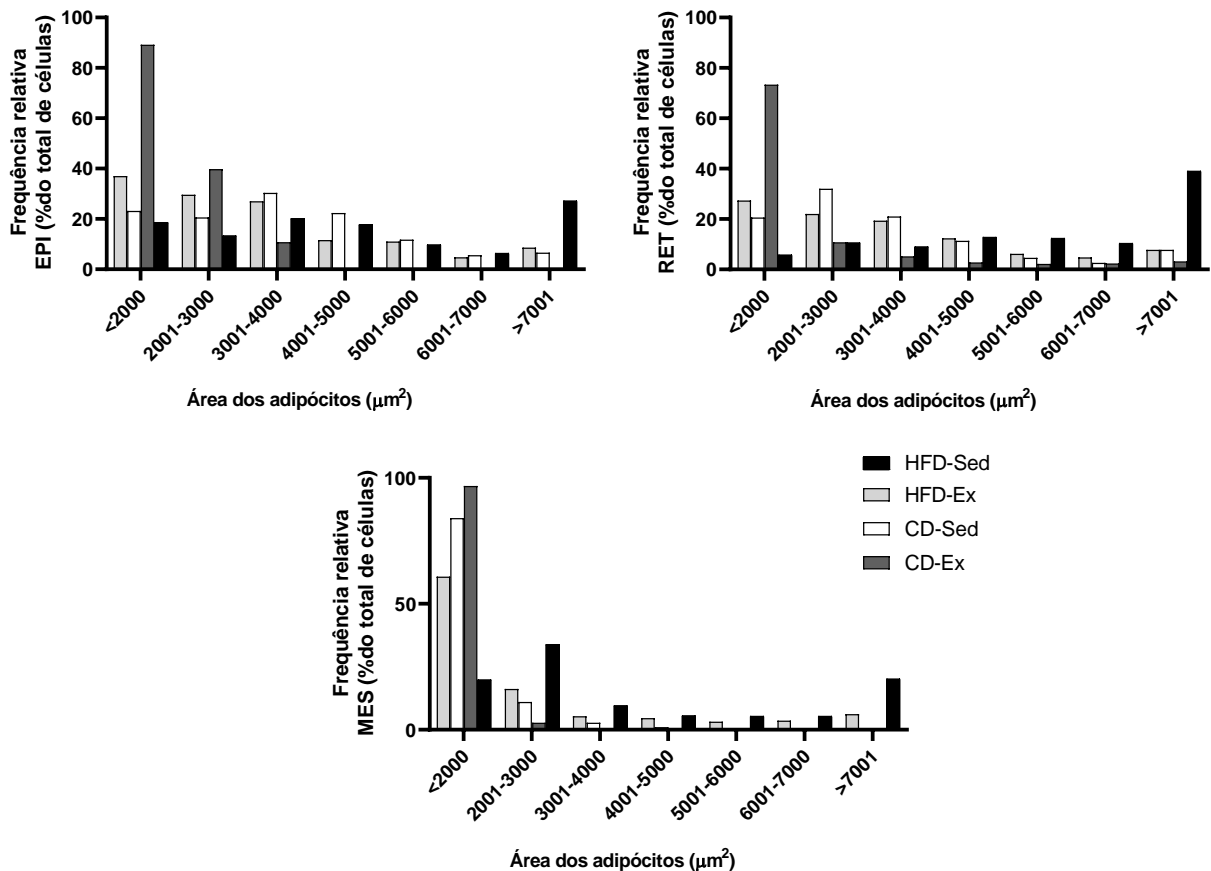
Seguindo a caracterização de Verboven et al. (2018) os adipócitos foram classificados como pequenos ( $<50 \mu\text{m}$ ), médios ( $50-69 \mu\text{m}$ ), grandes ( $70-89 \mu\text{m}$ ) e muito grandes ( $> 90 \mu\text{m}$ ) (VERBOVEN et al., 2018). Os animais HFD-Sed tiveram nos três depósitos viscerais adipócitos grandes ( $> 75 \mu\text{m}$ ), no entanto no tecido retroperitoneal, os adipócitos foram classificados como muito grandes. Já os animais do grupo HFD-Ex apresentaram adipócitos médios nos três compartimentos, semelhantes ao diâmetro dos animais CD-Sed. Os animais CD-Sed também apresentaram adipócitos pequenos no tecido MES. Já o grupo CD-Ex, mostrou redução em todos os adipócitos e foram observados adipócitos classificados como pequenos (EPI e MES) e médios (RET).

Houve efeito da dieta ( $p<0,001$ ) de forma isolada na área e diâmetro dos adipócitos do EPI, RET e MES. Foi observado efeito do exercício nas áreas e diâmetros do EPI e RET. A interação dieta e exercício não promoveu efeito nas áreas e diâmetros dos adipócitos.

A frequência de distribuição dos adipócitos EPI, RET e MES de cada depósito foi categorizado de com o seu tamanho ( $<2000 \mu\text{m}^2$ ,  $2001-3000 \mu\text{m}^2$ ,  $3001-4000 \mu\text{m}^2$ ,  $4001-5000 \mu\text{m}^2$ ,  $5001-6000 \mu\text{m}^2$ ,  $6001-7000 \mu\text{m}^2$ ,  $>7001 \mu\text{m}^2$ ) em comparação ao número total de adipócitos contados (% total), como demonstrado na Figura 18. Foram classificados como pequenos, adipócitos com até  $5000 \mu\text{m}^2$  e como grandes adipócitos maiores de  $5000 \mu\text{m}^2$  (PORET et al., 2018). O gráfico evidencia uma maior frequência de adipócitos pequenos em animais treinados e maior em animais sedentários. Mais especificamente, o grupo HFD-Sed tem a maior frequência de adipócitos EPI, RET e MES acima de  $5000 \mu\text{m}^2$  e a menor frequência abaixo de  $4000 \mu\text{m}^2$ . O grupo HFD-Ex concentrou em torno de 50% dos adipócitos EPI, e RET até  $3000 \mu\text{m}^2$ , já os adipócitos MES mostraram que mais de 50% dos adipócitos são menores que  $<2000 \mu\text{m}^2$ . Em relação aos animais do grupo CD-Ex, mais de 70% dos adipócitos EPI, RET e MES se encontram na faixa  $<2000 \mu\text{m}^2$ . Os animais do grupo CD-Sed apresentaram aproximadamente 70% dos adipócitos de

até 4000  $\mu\text{m}^2$  nos depósitos EPI e RET. No entanto no MES, foi verificado que o CD-Sed concentrava mais de 80% dos adipócitos, na faixa de menos de 2000  $\mu\text{m}^2$ .

**Figura 18 - Frequência relativa (%) da área dos adipócitos EPI, RET e MES após 8 semanas de intervenção dietética e exercício.**

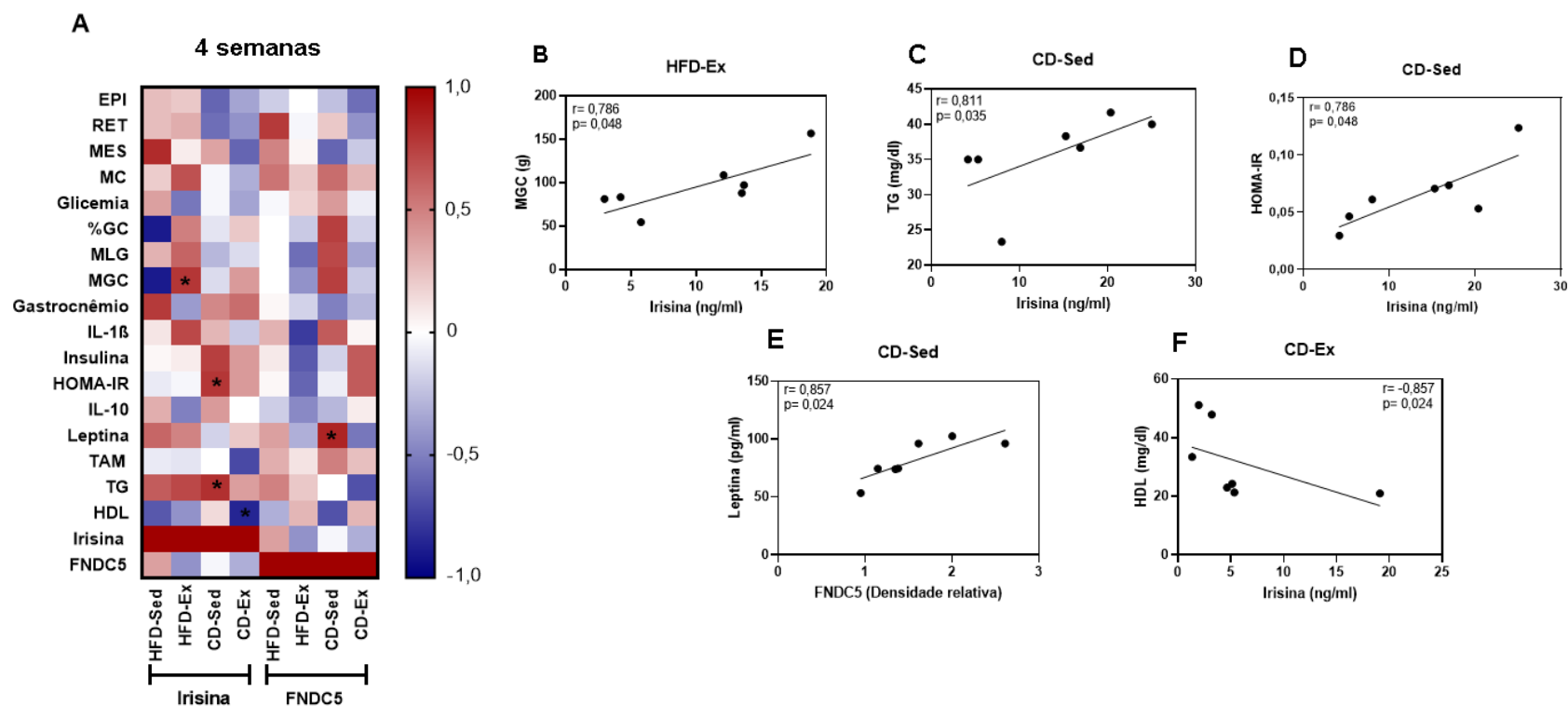


EPI: tecido adiposo epididimal; RET: tecido adiposo retroperitoneal; MES: tecido adiposo mesentérico. HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Para verificar se houve correlação dos parâmetros metabólicos com a composição corporal dos animais, foi realizada uma correlação matriz nas variáveis de estudo. Os mapas de calor foram construídos com as correlações de Spearman (Figura 19 e 20). Após as 4 semanas (Figura 19) de intervenção foi evidenciada uma correlação positiva no animal HFD-Ex entre irisina e MGC ( $r=0,786/ p=0,048$ ); nos animais CD-Sed entre irisina e TG ( $r=0,811/ p=0,035$ ); entre irisina e HOMA-IR ( $r=0,786/ p=0,048$ ) e entre FNDC5 e leptina ( $r=0,857/ p=0,024$ ). Nos animais CD-Ex foi observada uma correlação negativa entre irisina e HDL ( $r=-0,857/ p=0,024$ ). Após as 8

semanas (Figura 20) foram evidenciadas correlações significativas no grupo CD-Sed, correlação positiva e forte entre irisina e MC ( $r = -0,943 / p = 0,017$ ) e forte e negativa entre irisina e TG ( $r = -0,899 / p = 0,028$ ); entre FNDC5 e área do MES ( $r = -1,000 / p = 0,017$ ) e entre FNDC5 e diâmetro do MES ( $r = -1,000 / p = 0,017$ ). Foi observada uma correlação positiva forte entre FNDC5 e EPI ( $r = 0,786 / p = 0,0048$ ) nos animais CD-Ex.

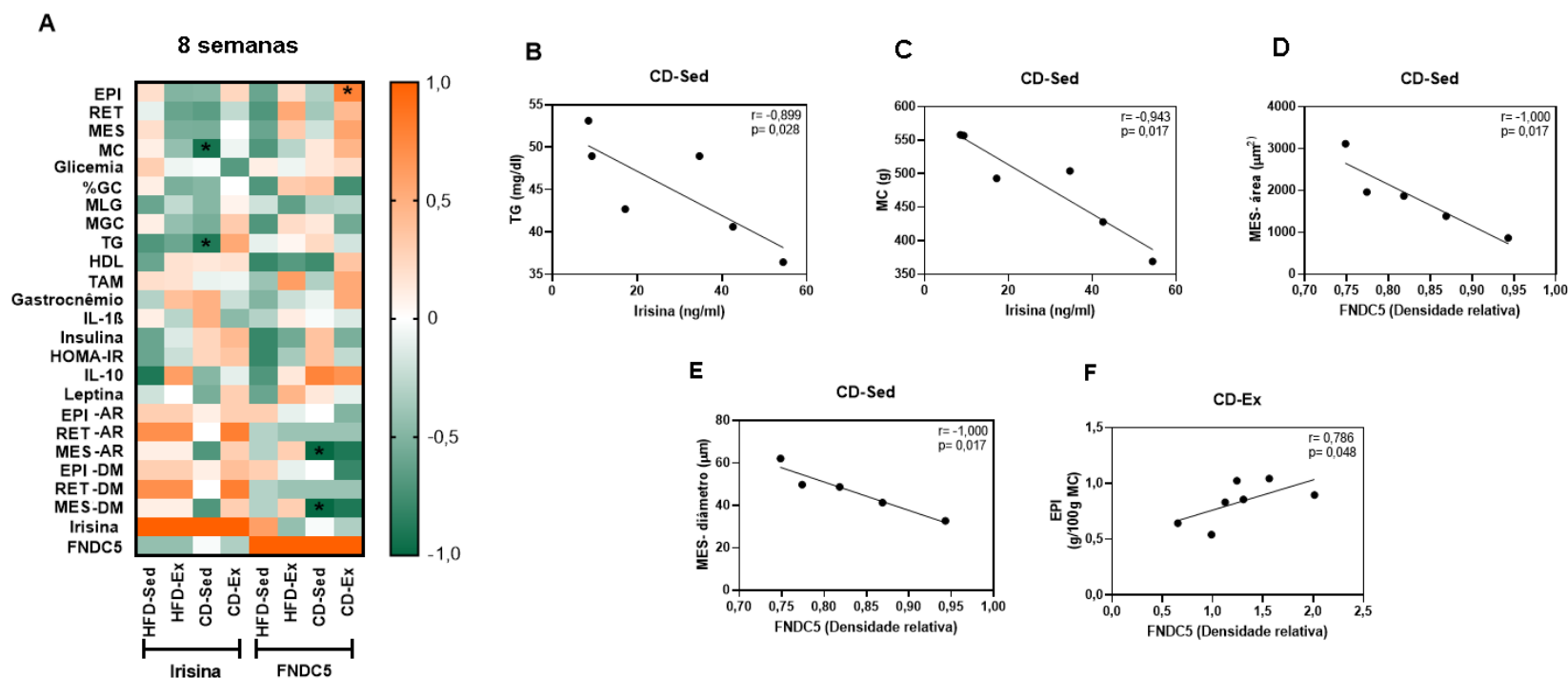
**Figura 19 - Correlação de Spearman entre irisina/FNDC5 e características gerais do estudo após 4 semanas de intervenção dietética e exercício.**



(A) Mapa de calor da correlação de Spearman entre irisina/FNDC5 e características gerais do estudo. A intensidade da cor varia de 0 (coeficiente de correlação fraco) até +1/-1 (coeficiente de correlação forte); (B) Correlação entre irisina e massa de gordura corporal (MGC) no dieta hiperlipídica treinado (HFD-Ex); (C) Correlação entre irisina e triglicerídeos (TG) no grupo dieta padrão sedentário (CD-Sed); (D) Correlação entre irisina e HOMA-IR no grupo CD-Sed; (E) Correlação entre FNDC5 e leptina no grupo CD-Sed; (F) Correlação entre irisina e HDL no grupo CD-Sed. EPI: tecido adiposo epididimal; RET: tecido adiposo retroperitoneal; MES: tecido adiposo mesentérico; MC: massa corporal; %GC: percentual de gordura corporal; MLG: massa livre de gordura; MGC: massa de gordura corporal; IL-1 $\beta$ : interleucina 1-beta; HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina; IL-10: interleucina-10; TAM: tecido adiposo marrom; TG: triglicerídeos; HDL: lipoproteína de alta densidade; FNDC5: fibronectina tipo III- contendo domínio 5. HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário. \*A correlação de Spearman é significativa com  $p < 0,05$ . Fonte: elaborada pelo próprio autor.



**Figura 20 - Correlação de Spearman entre irisina e FNDC5 e características gerais do estudo após 8 semanas de intervenção dietética e exercício.**



(A) Mapa de calor da correlação de Spearman entre irisina/FNDC5 e características gerais do estudo. A intensidade da cor varia de 0 (coeficiente de correlação fraco) até +1/-1 (coeficiente de correlação forte); (B) Correlação entre irisina e triglicérides (TG) no grupo dieta padrão sedentário (CD-Sed); (C) Correlação entre irisina e massa corporal (MC) no grupo CD-Sed; (D) Correlação entre FNDC5 e área do tecido adiposo mesentérico (MES) no grupo CD-Sed; (E) Correlação entre FNDC5 e diâmetro do MES no grupo CD-Sed; (F) Correlação entre FNDC5 e tecido adiposo epididimal (EPI) no grupo dieta padrão treinado (CD-Ex). EPI: tecido adiposo epididimal; RET: tecido adiposo retroperitoneal; MES: tecido adiposo mesentérico; MC: massa corporal; %GC: percentual de gordura corporal; MLG: massa livre de gordura; MGC: massa de gordura corporal; TG: triglicérides; HDL: lipoproteína de alta densidade; TAM: tecido adiposo marrom; IL-1 $\beta$ : interleucina 1-beta; HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina; IL-10: interleucina-10; AR: área; DM: diâmetro; FNDC5: fibronectina tipo III- contendo domínio 5; HFD-Ex: grupo dieta hiperlipídica treinado; HFD-Sed: grupo dieta hiperlipídica sedentário; CD-Ex: grupo dieta padrão treinado; CD-Sed: grupo dieta padrão sedentário; FNDC5: fibronectina tipo III- contendo domínio 5. \*A correlação de Spearman é significativa com  $p < 0,05$ . Fonte: elaborada pelo próprio autor.

### 5.2.3 Discussão

#### 5.2.3.1 Efeitos do treinamento físico em modelos animais induzidos a obesidade

O exercício físico promove efeitos que preservam a função do tecido adiposo branco saudável, diminuindo a adiposidade e atenuando os distúrbios metabólicos relacionados à obesidade (ROCHA-RODRIGUES et al., 2018b; VERHEGGEN et al., 2016). Nesse estudo mostramos que o exercício físico de forma isolada promoveu alterações precoces (após 4 semanas) mais pronunciadas em marcadores metabólicos e inflamatórios (TG, HOMA-IR, irisina, IL-1 $\beta$  e FNDC5) e aumentou a massa do gastrocnêmio. Após longo prazo do treinamento físico (8 semanas), observamos que as alterações significativas foram visualizadas mais em parâmetros relacionados a adiposidade corporal (EPI, RET, MES, diâmetro do RET e gastrocnêmio) do que em marcadores bioquímicos (IL-1 $\beta$ ). Esta sequência de modificações, podem sinalizar que a regulação metabólica, induzida inicialmente pelo treinamento, seja necessária para que o emagrecimento, ou mesmo a mudança na composição corporal aconteça.

Os efeitos do exercício no tecido adiposo marrom ainda não foram completamente elucidados e ainda existem algumas divergências na literatura (DEWAL; STANFORD, 2019). Por um lado, achados mostram que em resposta à estimulação adrenérgica, induzida pelo exercício, o tecido adiposo marrom, aumenta a atividade mitocondrial e a funcionalidade para apoiar a termogênese (DEWAL; STANFORD, 2019). Os estudos ainda reforçam essa teoria e mostram que o exercício promove efeitos benéficos ao aumentar a expressão de genes termogênicos associados com biogênese mitocondrial, como a UCP-1 e PGC1- $\alpha$ , que resulta na redução da massa corporal, massa de gordura corporal e melhora do metabolismo da glicose, incluindo sensibilidade à insulina (DEWAL; STANFORD, 2019; LOYD; OBICI, 2014). Por outro lado, já foi observado que o exercício resulta no aumento da temperatura corporal, promovendo uma redução do efeito termogênico do tecido adiposo marrom. Portanto, acredita-se que o tecido adiposo marrom tem além de menor massa, uma função mais hipoativa durante o exercício físico (DEWAL; STANFORD, 2019; WU et al., 2014). Nossos achados concordam com o exposto anterior e o exercício de forma isolada mostrou não alterar os valores frente ao exercício, o que podem sugerir uma hipoatividade do tecido adiposo marrom.

Em relação aos demais depósitos do tecido adiposo. O exercício exclusivamente mostrou reduzir a massa de todos os depósitos viscerais após 8 semanas. Essas alterações ocorreram de forma independente da massa corporal, massa de gordura corporal e percentual de gordura, que não apresentaram diferenças nessa situação. Os resultados do presente estudo são apoiados por pesquisas anteriores. Está bem estabelecido na literatura os benefícios do exercício em animais obesos (BAE et al., 2017; KAWANISHI et al., 2015; KOLAHDOUNI et al., 2019; PIERARD et al., 2016; ROCHA-RODRIGUES et al., 2018b). No entanto, nesses achados a redução dos depósitos viscerais, foi acompanhada de diminuição da massa corporal e/ou massa de gordura, diferente do que aconteceu no nosso estudo. Lu et al. (2016) observaram diminuição dos depósitos viscerais, após 8 semanas de natação em animais obesos (LU et al., 2016). Bae et al. (2017) mostraram que animais obesos induzidos a obesidade, submetidos ao protocolo de esteira por 8 semanas tiveram redução de massa corporal, massa de gordura e adiposidade visceral. Baek et al. (2018) mostraram que ratos obesos após 6 semanas de protocolo de esteira, 5x/semana, apresentaram redução da adiposidade abdominal e massa corporal (BAEK et al., 2018). Kolahdouzi et al. (2019) mostraram que ratos *Wistar* obesos submetidos ao protocolo de esteira por 10 semanas, 5x/semana, tiveram redução dos depósitos inguinais, mesentéricos, retroperitoneais, epididimais e perirrenais quando comparados aos controles. Essas alterações foram acompanhadas de atenuação significativa do ganho de peso, massa de gordura e índice de adiposidade. Sprague-Dawley induzidos a obesidade por 3 semanas com dieta de cafeteria e submetidos ao treinamento em esteira por 4 semanas por 45 minutos (5x/semana) também mostraram redução dos depósitos epididimal e retroperitoneal, mas também foram acompanhados de redução na massa de gordura corporal (LEIGH et al., 2020).

Embora não tenhamos observado alteração na massa corporal e dos parâmetros de composição corporal entre os animais obesos treinados e sedentários, diversos fatores como intensidade, frequência semanal, estado nutricional, volume, interferem nas repostas metabólicas do treinamento. Sugerimos que a discordância dos resultados, possa ser devido à realização das sessões, 3 vezes por semana, que em indivíduos obesos talvez não seja suficiente para alterar a massa corporal e massa de gordura. Embora a ACSM recomende o mínimo de 150 minutos de exercício de intensidade moderada por semana de atividades; para alcançar uma perda significativa de massa corporal ( $\geq 5\%$ ), é recomendado de 225 a 420 minutos de exercício por semana

(DONNELLY et al., 2009; SWIFT et al., 2018). Reznick et al. (2007) ainda propuseram que exercícios executados 5 vezes por semana são necessários para que ocorra um aumento suficiente para elevar os níveis de AMP/ATP e ativar a AMPK (REZNICK et al., 2007). Ainda assim, 150 minutos de atividade física moderada a intensa fornece benefícios importantes para a saúde e na manutenção da perda de peso e para prevenir eventos cardiovasculares (GARBER, 2019); além de reduzir significativamente o tecido adiposo visceral (SABAG et al., 2017). Todos esses critérios mínimos foram aplicados ao protocolo desse estudo, portanto talvez seja necessária maior duração da intervenção do exercício para verificar os efeitos nos animais desse estudo. Ademais, os animais do grupo HFD-Ex desse estudo tiveram aumento na capacidade máxima de exercício desde o início do treinamento, expresso através da velocidade máxima registrada a cada 4 semanas, o que mostra que as adaptações cardiorrespiratórias e musculares referentes ao programa de treinamento delineados nesse estudo foram melhoradas.

Além da massa do tecido adiposo, a composição dos adipócitos é fundamental para compreender as repercussões metabólicas proporcionadas pela obesidade. Isso porque sabemos que o aumento do tamanho dos adipócitos através da hipertrofia determina um prejuízo no metabolismo que pode resultar no aumento de citocinas inflamatórias (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010; JEANSON; CARRIÈRE; CASTEILLA, 2015). Dessa forma, investigamos de que forma o exercício influencia a morfometria dos adipócitos viscerais especialmente nas diferentes localizações.

A alteração no tamanho das células adiposas é determinada pelo balanço entre lipogênese e lipólise (JO; SHREIF; PERIWAL, 2012). Frente a um balanço energético positivo a taxa lipogênica se torna predominante a taxa lipolítica, aumentando o volume do adipócito através da incorporação de triglicerídeos. Esse fenômeno é comumente observado na obesidade, através da expansão do volume, diâmetro e número de adipócitos. Achados por Jo, Shreif e Periwal (2012), evidenciaram que as células adiposas de diâmetro de 200  $\mu\text{m}$  contêm 1.000 vezes mais lipídeos do que uma célula adiposa com diâmetro de 20  $\mu\text{m}$  (JO; SHREIF; PERIWAL, 2012). Uma das principais funções do exercício na obesidade é controlar a expansão dos adipócitos através da recuperação da expressão de genes que expressam moléculas ligadas a oxidação de gordura e lipogênese (WANG et al., 2017). Nos nossos animais, observamos que a área dos adipócitos não sofreu ação exclusiva do exercício após 8 semanas de intervenção. Já em relação ao diâmetro,

apenas os adipócitos retroperitoneais tiveram valores menores em animais HFD-Ex quando comparados ao grupo HFD-Sed. Nossos dados corroboram parcialmente com estudos anteriores, uma vez que não foram observadas alterações em todos os depósitos viscerais avaliados nesse estudo. Ratos induzidos a obesidade (71% de gordura) por 17 semanas, após serem submetidos ao exercício físico tanto na forma espontânea quanto ao protocolo de esteira (5x/semana-60min/dia) por 8 semanas, mostraram redução na área de adipócitos e a porcentagem de adipócitos com tamanho maior que  $5000 \mu\text{m}^2$ , em relação aos sedentários (ROCHA-RODRIGUES et al., 2017). Em ratos induzidos a obesidade (27% de gordura) que foram submetidos a um protocolo de treinamento (esteira: 5x/semana-60min/dia- 40-60% da  $V_{\text{máx}}$ ) por 7 semanas, mostraram redução na área dos adipócitos epididimais em torno de 40% (GARCIA et al., 2016). Portanto, nossos resultados sugerem que os adipócitos retroperitoneais respondam mais ao exercício. Já os adipócitos mesentéricos e epididimais não foram responsivos ao exercício. Essas alterações sugerem que o exercício module de forma diferente os adipócitos viscerais frente ao treinamento. Nossos dados podem ser explicados pois frente ao exercício, já foi observado que o depósito retroperitoneal aumenta a expressão de genes envolvidos na atividade mitocondrial e metabolismo de ácidos graxos, justificando o fato da redução dos adipócitos em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Já os depósitos epididimais apesar de mostrarem aumento da atividade mitocondrial basal, tem efeitos diversos em genes envolvidos na captação e oxidação de ácidos graxos, o que poderia promover uma redução mais discreta (LEHNIG et al., 2019). Ainda, os depósitos mesentéricos mostram uma alta expressão de genes relacionados à lipogênese e uma baixa expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos (BJØRNDAL et al., 2011).

A avaliação da composição corporal, ainda mostrou que em relação a massa livre de gordura, não houve alteração pelo exercício. Os dados discordam do exposto anterior, que reforça que o exercício é uma das estratégias mais efetivas de forma independente na preservação da massa muscular em indivíduos obesos (TROUWBORST et al., 2018). Acreditamos que a falta de diferença entre animais alimentados com dieta hiperlipídica, se deve ao fato de que a massa de gordura corporal representa um fator limitante ao desempenho máximo ao exercício. Estudos reforçam que a massa livre de gordura e a duração do exercício tem correlação mais intensa em indivíduos com menor percentual de gordura (ZHU et al., 2011). Dessa forma, embora os animais obesos desse estudo tenham executado o treino prescrito, indivíduos com maior massa de gordura

tendem a apresentar mais problemas articulares que podem interferir no desempenho na esteira. Ainda que, o rato por ser quadrúpede tenha distribuição de forma mais uniforme da sua massa corporal, as limitações físicas no desempenho do treinamento ainda são maiores do que animais com menor massa corporal. Outro fator é que o músculo esquelético é o principal componente da massa livre de gordura e, portanto, as diferentes características do músculo esquelético entre pessoas com elevada e baixa massa de gordura podem afetar adversamente a função muscular (ACEVEDO et al., 2017; ZHU et al., 2011).

Como mencionado o músculo esquelético é o principal componente da massa livre de gordura e, portanto, investigamos os grupos musculares para compreender as diferenças encontradas anteriormente (ACEVEDO et al., 2017; ZHU et al., 2011). Nossos resultados evidenciaram que o músculo gastrocnêmio, sofreu alterações na quarta e oitava semana de treinamento. No grupo obeso treinado, o gastrocnêmio esteve com a massa mais elevada na quarta e na oitava semana. Já, o músculo sóleo e o EDL não apresentaram diferenças após o exercício. Embora não tenhamos visualizado alterações em todos os grupos musculares, nossos dados corroboram com o exposto anterior, de que o exercício é uma estratégia amplamente utilizada para promover a preservação da musculatura esquelética e hipertrofia muscular e, pode ao mesmo tempo em que reduz a gordura muscular e visceral, manter a manutenção da musculatura esquelética, melhorar a força muscular e o desempenho físico mesmo na condição de obesidade sarcopênica (TROUWBORST et al., 2018).

Dentre as adaptações metabólicas do exercício, o aumento da sensibilidade à insulina pelos tecidos viabiliza a maior captação de glicose. Esse processo ainda pode ocorrer por vias independentes da ação da insulina, uma vez que a contração muscular favorece translocação da vesícula do GLUT4 para a membrana celular (BRADLEY et al., 2015; ROGERS et al., 1988). Em condições fisiológicas, o exercício aeróbico de intensidade moderada causa uma redução nas concentrações de glicose ao aumentar a captação de  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  (CAMACHO et al., 2005; SAVIG, 2012). O efeito hipoglicemiante do exercício, já foi observado por outros estudos, incluindo aumento na captação de glicose, redução dos valores de glicemia, aumento no *Glut4* mRNA em gastrocnêmio e sóleo (GURLEY; GRIESEL; OLSON, 2016; KURAUTI et al., 2016; PAULI et al., 2009; YU et al., 2016). Importante destacar que esses efeitos ocorrem tanto na forma aguda quanto na forma crônica (RÖHLING et al., 2016). No entanto, nesse estudo, o exercício de

forma exclusiva mostrou não alterar os valores de glicemia em nenhum dos grupos avaliados. Para apoiar nossos achados e determinar a influência do exercício no perfil glicêmico avaliamos ainda a secreção de insulina e calculamos o índice de HOMA-IR.

Já foi observado em roedores induzidos a obesidade, a redução da insulinemia (CHANG et al., 2020; YU et al., 2016) e da secreção da insulina após o exercício mediado via  $\alpha_2$ -adrenoceptors de forma dependente da intensidade para favorecer o controle glicêmico (AARNIO; LAURITSEN; DELA, 2001). O efeito principal do exercício na resistência insulínica é observado no tecido muscular e em menor escala no tecido adiposo (DELA; STALLKNECHT, 2010). Os mecanismos envolvem um possível *crosstalk* entre músculos e pâncreas (MIZGIER et al., 2014), redução da fosforilação do IRS-1 em serina (PAULI et al., 2009) e aumento da depuração da insulina plasmática (KURAUTI et al., 2016). Um estudo clássico conduzido por Rogers et al. (1998) mostraram que apenas 1 semana de treinamento aeróbico, em diabéticos não dependentes de insulina resultou em uma redução de 32% na área sob a curva de insulina. Achados mais recentes mostraram que animais induzidos a obesidade por 4 semanas, que estiveram submetidos a um protocolo de esteira por 12 semanas (5x/ semanas) mostraram redução da glicemia, redução da insulina sérica, redução do índice HOMA-IR e aumento da sensibilidade à insulina em relação aos controles não treinados (CHANG et al., 2020). Estudos mostram consistentemente que o exercício aeróbico moderado por 30 minutos ou mais, pelo menos três vezes por semana por 8 semanas ou mais melhora a sensibilidade à insulina e outros marcadores de controle glicêmico (BIRD; HAWLEY, 2017). No nosso estudo, não observamos redução da insulina plasmática após 4 e 8 semanas de exercício físico entre os grupos. No entanto, observamos que em 4 semanas, os animais obesos exercitados tiveram redução do índice HOMA-IR quando comparados ao grupo HFD-Sed. A avaliação do índice HOMA-IR tem sido um modelo eficiente para avaliar a função das células  $\beta$  e a resistência à insulina (GALLO VALLEJO; DÍAZ LÓPEZ; CARMONA SALGADO, 2007). E embora não foi verificado alteração pelo exercício na glicemia, o exercício parece aumentar a sensibilidade à insulina nos animais treinados a curto prazo. Acreditamos, portanto, que a redução do índice HOMA-IR em animais obesos treinados, reafirmam o efeito do exercício na melhora da sensibilidade insulínica, mas que provavelmente ainda não foi suficiente para promover um significativo aumento na captação de glicose e alterar os níveis circulantes da glicemia. Por fim, avaliamos o peso do pâncreas nos animais desse estudo com achados recentes mostraram pela

primeira vez, que o exercício físico reduziu a gordura pancreática de forma independente da tolerância a glicose basal (HEISKANEN et al., 2018). No entanto, não conseguimos confirmar esses achados nesse estudo e o exercício não alterou a massa pancreática.

A dislipidemia é resultante da inatividade física e do consumo de dieta hiperlipídica. Associado a esse processo, a elevação de HDL e triglicerídeos contribuem de forma direta para a progressão da aterosclerose (NORDESTGAARD; WOOTTON; LEWIS, 1995; TOTH et al., 2013). Sabe-se que o exercício aeróbico regular articula efeitos positivos em doenças cardiovasculares, em parte mediados por alterações no metabolismo lipídico (GORDON; CHEN; DURSTINE, 2016). Estudos recentes demonstraram que o treinamento aeróbico de moderada intensidade promove melhorias no perfil lipídico de indivíduos obesos e eutróficos (GORDON; CHEN; DURSTINE, 2016; KO et al., 2018; THEODOROU et al., 2016). Uma meta-análise mostrou que o treinamento aeróbico reduz aproximadamente 2% do colesterol total; 11% do triglicerídeos e aumenta aproximadamente 4% do HDL (GORDON; CHEN; DURSTINE, 2016). Ko et al. (2018) observaram a redução dos triglicerídeos sem alterações no HDL em ratos que foram submetidos ao protocolo de esteira por 8 semanas. Nossos achados corroboram parcialmente com resultados anteriores, uma vez que conseguimos visualizar o efeito isolado do exercício apenas nos níveis de triglicerídeos, porém não nos níveis de HDL. Observamos que os triglicerídeos foram reduzidos no grupo obeso treinado, mas somente nas primeiras 4 semanas de intervenção. Esses dados mostram que apesar do consumo de dieta hiperlipídica aumentar os níveis de triglicerídeos, o exercício foi eficiente em utilizar o triglicerídeo plasmático como substrato energético para oxidação. Os dados também corroboram com os valores de glicemia observados nesse estudo. A glicemia provavelmente não teve predominância em ser utilizada como substrato energético durante a maioria do treinamento, o que pode ter direcionado os triglicerídeos plasmáticos como substrato principal e justificar a sua redução. Ainda que a intensidade executada do exercício promova maior captação de glicose, os níveis extenuantes da atividade podem ter levado a um consumo significativo de triglicerídeos, mesmo que por um curto período.

O consumo da dieta hiperlipídica por um período longo leva ao aumento da internalização de ácidos graxos que são armazenados como gotículas lipídicas. A deposição ectópica de lipídeos no fígado promove um aumento na expressão de citocinas inflamatórias que leva a disfunções metabólicas (FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010; MANNE; SAAB, 2014). Um dos efeitos



observados é o aumento da porcentagem de hepatócitos binucleados. Células binucleadas são indicativos de divisão celular e regeneração frente a processos inflamatórios e necróticos (GRIZZI; CHIRIVA-INTERNATI, 2007; NEVES et al., 2006; SCHULTZ et al., 2013). Em conjunto o aumento de vesículas de gordura hepática e células binucleadas correspondem ao processo inflamatório resultante do consumo de dietas hiperlipídica (NEVES et al., 2006). Portanto atenuar esse processo deve ser parte das estratégias para o controle das comorbidades associadas a obesidade. Dessa forma, Alex et al. (2015) mostraram que em um modelo de esteatose hepática, o treinamento físico (5x/semana- 60 minutos) por 3 semanas foi capaz de reduzir a esteatose hepática devido à regulação do metabolismo oxidativo mediada por PPAR $\alpha$  (ALEX et al., 2015). Ainda, em animais induzidos a obesidade por 8 semanas, foi observada a presença de esteatose hepática. Desses animais que foram submetidos ao treinamento físico de intensidade média em esteira por 15 semanas a formação de vesículas de gordura hepática foi suprimida, além de mostrar a redução de proteínas relacionadas ao dano hepático (CHO et al., 2018). De forma contrária ao reportado na literatura, nossos achados mostraram que o exercício não alterou o peso do fígado, o conteúdo lipídico ou teve influência nas células binucleadas hepáticas. Nossos resultados discordam dos achados prévios, esses dados podem indicar uma taxa oxidativa prejudicada devido à sobrecarga elevada de gordura proveniente da dieta hiperlipídica, o que provavelmente favoreceu a reesterificação e deposição de lipídeos ectópicos. Outra possibilidade pode ser que a redução das vesículas hepáticas não ocorreu pois, durante o exercício as principais fontes de ácidos graxos que foram usados como substratos para suprir a demanda energética vieram majoritariamente do tecido adiposo e muscular (MUSCELLA et al., 2020).

O treinamento físico é um aliado fundamental no tratamento da obesidade especialmente no processo inflamatório (BARRY et al., 2018; PETERSEN; PEDERSEN, 2006). Isso porque, além de reduzir a adiposidade visceral e conseqüentemente atenuar a secreção de adipocinas inflamatórias, o músculo é um importante órgão endócrino, secretor de fatores que regulam o metabolismo (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). Durante o treinamento físico, o músculo facilita a criação de um ambiente anti-inflamatório (PETERSEN; PEDERSEN, 2006), levando a concentrações de citocinas inflamatórias basais reduzidas e anti-inflamatórias aumentadas (BARRY et al., 2018). A concentração dessas citocinas durante o exercício é modulada de forma dependente da intensidade (DORNELES et al., 2016; PETERSEN; PEDERSEN, 2006), tipo

(DORNELES et al., 2016), duração do exercício (FISCHER, 2006) e a quantidade de massa muscular recrutada (PETERSEN; PEDERSEN, 2006). Speretta et al. (2012) mostraram que animais induzidos a obesidade, expressaram um fenótipo pró-inflamatório que foi atenuado pelo exercício (SPERETTA et al., 2012). Os animais que praticaram natação (60 min/dia, 5x/semana, 8 semanas), mostraram aumento da IL-10 e redução do TNF- $\alpha$ , mostrando os efeitos benéficos do treinamento físico sobre as interleucinas. Em outra investigação, o protocolo de esteira (60m/dias, 5x/semana, 8 semanas) elevou a relação IL-10/TNF- $\alpha$  do músculo gastrocnêmio em ratos treinados quando comparado com ratos sedentários (CALEGARI et al., 2018). Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa na citocina IL-10. Esses resultados já foram reportados em achados prévios. Na intensidade moderada e vigorosa, o exercício aeróbico não promoveu alterações significativas nos marcadores inflamatórios na citocina IL -10 entre pré e pós-exercício (DOS SANTOS et al., 2019). Exercícios intervalados de alta intensidade, mostraram elevar as concentrações de IL-10 em obesos e magros, após 30 minutos depois de uma sessão de exercícios, enquanto o exercício intervalado de moderada intensidade não afetou significativamente as concentrações das citocinas (DORNELES et al., 2016). Uma possível explicação é que diferente dos estudos citados, a nossa frequência semanal utilizada para o exercício foi de 3x/semana, essa periodicidade pode ter sido insuficiente para promover aumento da citocina.

O exercício estimula aumentos moderados a grandes nas concentrações circulantes de IL-1Ra, e parece aumentar de forma mais discreta a IL-1 $\beta$  no entanto esses resultados são inconclusivos. Isso porque embora muitas das citocinas também são expressas no músculo esquelético, nem todas são liberadas do músculo esquelético para a circulação durante exercício. Dessa forma, a expressão de mRNA de IL-1 $\beta$  no músculo esquelético aumenta após o exercício, porém as concentrações circulantes dessas citocinas permanecem comparativamente baixas após o exercício (PEAKE et al., 2015). Salamat et al. (2016) reafirmaram esses achados ao demonstrar que após 8 semanas de treinamento aeróbico os níveis de IL-1 $\beta$  estiveram reduzidos em obesos submetidos a um protocolo de treinamento aeróbico (3x/semana) (SALAMAT et al., 2016). Nossos resultados interessante mostraram que a IL-1 $\beta$  esteve elevada nos animais obesos treinados em relação aos seus pares não treinados na quarta semana, porém após 8 semanas, os animais obesos treinados apresentaram significativa redução em relação aos animais obesos não treinados. Esses resultados já foram visualizados após 3 horas de caminhada com inclinação e

ciclismo de moderada intensidade mostraram que as concentrações plasmáticas de IL-1 $\beta$  atingiram o pico no final do exercício e permaneceram elevadas em até 24h após o exercício (MOLDOVEANU; SHEPHARD; SHEK, 2000; NIELSEN et al., 2016). Acreditamos que a curto prazo (4 semanas) a IL-1 $\beta$  foi transitoriamente elevada como resposta ao exercício físico, mas esses valores parecem não promover efeitos deletérios no metabolismo da glicose, uma vez observado que a insulina, a glicemia e o índice HOMA-IR não se encontram elevados nesses animais. No entanto, após 8 semanas de treinamento os níveis de IL-1 $\beta$  dos animais HFD-Ex foram reduzidos, corroborando com os achados anteriores. Sugerimos, portanto, que esse comportamento reflète os efeitos crônicos do exercício nos animais obesos, uma vez que observamos que os animais HFD-Ex não apresentaram distúrbios no metabolismo da glicose ou resistência à insulina pelos tecidos corroborando com os achados da IL-1 $\beta$ .

Diversos estudos se propuseram a investigar os efeitos da leptina no treinamento físico. De uma forma geral, em roedores e humanos, o exercício físico parece reduzir ou não promover alterações nas concentrações de leptina (BOUASSIDA et al., 2006). Dados antigos confirmam esses achados e uma revisão apontou que após 12 semanas de treinamento as concentrações de leptina estão reduzidas (BOUASSIDA et al., 2006). A literatura atualizada reafirmou essa ideia e mostrou redução após 3h e 6h após ciclo ergômetro em homens treinados (LAURSEN et al., 2017); o exercício também aliviou a resistência a leptina e diminuiu a concentração sérica de camundongos obesos submetidos a natação por 8 e 18 semanas (YI et al., 2017). No entanto os resultados ainda são conflitantes e já foi visualizada que menos de 12 semanas de treinamento, não promovem alterações nas concentrações de leptina (BOUASSIDA et al., 2006), o treinamento aeróbico de curto prazo (60 minutos durante 7 dias sucessivos) não modificou as concentrações de leptina em homens jovens e idosos saudáveis (HOUMARD et al., 2000). Embora o principal fator que promova a redução de leptina frente ao treinamento físico seja o percentual de gordura, tanto na sua forma aeróbica ou resistida o exercício físico parece ser um fator independente da modulação dos níveis de leptina (FEDEWA et al., 2018). Unal et al. (2005) reforçaram essa hipótese mostrando que os valores mais baixos de leptina após o exercício foram encontrados em indivíduos com menor taxa de gordura (UNAL et al., 2005). Em consonância com os estudos anteriores, nossos dados mostraram que o exercício físico nas 4 e 8 semanas não promoveram alterações nas concentrações de leptina ainda que tenha sido observada redução nos depósitos viscerais e no

percentual de gordura em animais obesos treinados. Uma possível explicação é que a insulina parece regular a secreção de leptina nas células adiposas por mecanismos transcricionais (TSAI et al., 2012). E nesse estudo as concentrações séricas de insulina não sofreram alterações frente ao treinamento.

Os níveis circulantes de irisina estão aumentados em indivíduos envolvidos em atividades induzidas por exercícios e progressivamente reduzidos naqueles menos ativos e sedentários (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019). Muitos estudos mostraram que o treinamento de curto prazo (ANASTASILAKIS et al., 2014; AYDIN et al., 2014) e longo prazo (BOSTRÖM et al., 2012; KIM et al., 2016) elevaram a expressão de FNDC5 e níveis de irisina em humanos e animais promovendo efeitos pleiotrópicos. Contraditoriamente a essas descobertas, alguns estudos em humanos não conseguiram confirmar a resposta do mRNA de *Fndc5* e da irisina pelo exercício (HECKSTEDEN et al., 2013; HEW-BUTLER et al., 2015). Diversos estudos mostraram que o treinamento a curto e longo prazo modulam as concentrações de irisina e elevam a expressão de FNDC5. No entanto esses achados não são confirmados por todos os estudos (FATOUROS, 2018). Nossos dados corroboram com os estudos em humanos e aqui mostramos que embora não tenha sido comprovado efeito do exercício sobre a irisina, a única diferença a curto prazo, foi visualizada na irisina que foi reduzida em animais alimentados com dieta padrão treinados quando comparados a animais sedentários após 4 semanas de intervenção.

Ainda observamos que o exercício em animais alimentados com dieta padrão (CD-Ex) e hiperlipídica (HFD-Ex) mostraram uma diminuição na expressão proteica do FNDC5 no gastrocnêmio em relação ao grupo CD-Sed. Dados anteriores mostraram que animais submetidos a um protocolo de esteira por (5x/semana- 45 minutos) por 8 semanas mostraram que não houve alterações na concentração sérica de irisina, no entanto a expressão proteica do FNDC5 foi elevada nos animais obesos exercitados quando comparados aos sedentários (KAZEMINASAB et al., 2018). Ainda foi relatado que animais exercitados na esteira por 8 semanas não tiveram elevação na irisina e FNDC5 em animais obesos (SHIRVANI; DELPASAND; BAZGIR, 2018). Parte dos nossos achados podem ser explicados pois o músculo gastrocnêmio dos animais controle exercitados apresentaram massa significativamente reduzida em relação aos seus pares não exercitados, no entanto não foi observada correlação significativa entre essas duas variáveis. Por outro lado, essas discrepâncias podem ser explicadas pela variabilidade entre espécies. Em

humanos frequentemente os protocolos utilizados para avaliar a irisina e que falharam em mostrar aumento da irisina circulante foram realizados de 2 a 3 vezes por semana, enquanto que a maioria dos estudos em animais utilizou 5 vezes por semana (FATOUROS, 2018). Portanto nossos achados podem ser o reflexo do protocolo escolhido que mimetizava as condições humanas de treinamento.

Para avaliar de que forma as variáveis desse estudo se associam aos valores séricos de irisina/FNDC5, foi realizado o estudo das correlações de Spearman. No grupo CD-Sed foi observada uma elevação de FNDC5 que esteve positivamente correlacionado com a leptina. Nossos achados corroboram com estudos anteriores que mostraram que a leptina regulou positivamente a expressão de FNDC5 em miócitos C2C12 de murinos e estimulou a miogênese basal e a expressão mais baixa de mRNA de fatores relacionados à atrofia muscular (RODRÍGUEZ et al., 2015). Ainda, no grupo CD-Sed foi observada uma elevação de irisina sérica que esteve positivamente correlacionada com índice HOMA-IR. Esses resultados já foram observados anteriormente em homens e mulheres obesas (FUKUSHIMA et al., 2016), em homens e mulheres independentes do estado nutricional (PARK et al., 2013) e em pacientes com doenças renais (EBERT et al., 2014). Em contraste, em crianças do sexo feminino a irisina se correlacionou de maneira negativa com o índice HOMA-IR (AL-DAGHRI et al., 2014) assim como em homens obesos (MORENO-NAVARRETE et al., 2013).

Park et al. (2013) ainda mostraram que os indicadores de síndrome metabólica estiveram positivamente correlacionados com irisina, mesmo quando ajustado o IMC e a gordura corporal. Nossos dados corroboram os achados e foi evidenciada correlação positiva entre irisina e triglicérides nos animais CD-Sed. Essa mesma correlação já foi observada em indivíduos não diabéticos com sobrepeso, entretanto a correlação foi fraca e os demais marcadores antropométricos relacionados ao risco de doenças cardiovasculares foram relacionados de forma negativa a irisina (TANG et al., 2019). Ainda nos animais CD-Ex desse estudo foi observada correlação negativa da irisina com HDL, anteriormente reportada por Huh et al. (2012) em indivíduos obesos e não-obesos. Embora os valores de HDL não estejam significativamente elevados nos animais CD-Ex em relação ao CD-Sed, existe uma tendência para esse aumento, o que pode ter contribuído para a redução da irisina circulante nesses animais. Em conjunto esses dados reforçam que os valores de irisina/Fndc5 são regulados de forma diferente tanto na presença do exercício quanto em mudanças do estado nutricional. Sugerimos que a relação positiva com o

marcador inflamatório e triglicérides e negativa com HDL só seja efetiva enquanto o animal está com adiposidade reduzida, uma vez que não foram confirmados os mesmos achados nos animais alimentados com dieta hiperlipídica sedentários. Dados do nosso estudo podem reforçar essa hipótese uma vez que em animais do grupo HFD-Ex foi demonstrada correlação positiva com a massa de gordura. Embora não foi possível observar diferença significativa da massa de gordura entre animais HFD-Ex e HFD-Sed, existe uma tendência para a redução em animais HFD-Ex, o que poderia justificar os nossos achados. No entanto mais estudos são necessários para confirmar esses resultados.

Nesse estudo mostramos que o exercício físico de forma isolada promoveu a curto prazo, maiores alterações em parâmetros metabólicos do que na composição corporal. Dessa forma, a foi possível observar efeitos metabólicos positivos no metabolismo glicêmico, mas que não foi sustentado a longo prazo. Por outro lado, o treinamento físico de longo prazo promoveu redução da adiposidade visceral nos animais obesos, ao mesmo tempo que preservou a massa muscular, ressaltando a importância do exercício físico na manutenção da massa muscular esquelética no processo de emagrecimento. Nesse sentido, reafirmamos nesse estudo a importância da continuidade do programa de treinamento para se alcançar os efeitos cumulativos do exercício físico, especialmente na adiposidade visceral. Ainda, apenas após as 8 semanas de treinamento físico conseguimos observar atenuação dos marcadores inflamatórios ou bioquímicos oriundos da obesidade. Reforçamos que ao simular a frequência de exercícios praticados por humanos não conseguimos confirmar a expressão de irisina e FNDC5 através do exercício.

Além disso, para mimetizar as condições humanas é importante ressaltar que indivíduos obesos, que transitam do estado sedentário para iniciar a prática de atividades físicas não estão familiarizados com a prática regular de exercícios físicos e podem apresentar riscos aumentados para lesões músculo esqueléticas devido ao excesso de peso. Portanto, é importante determinar duração, intensidade, tipo e progressividade adequados. Acreditamos que esse programa possa ser incluído como programa inicial de treinamento objetivando a redução da adiposidade visceral. Ainda, é importante destacar que são necessários mais estudos que mimetizem as condições humanas de obesidade e exercício para que possuam uma maior reprodutibilidade em humanos a fim de auxiliar em estratégias para controle e tratamento da obesidade.

### 5.2.2.2. Efeitos da intervenção dietética em modelos animais induzidos a obesidade

A manutenção do peso corporal por meio de dieta é benéfica na prevenção de distúrbios metabólicos associados à obesidade. Essa alteração no consumo de energia tem sido associada a proteção contra doenças cardiovasculares, especialmente redução na adiposidade visceral e melhora nos parâmetros bioquímicos (GOLBIDI et al., 2017; GONZÁLEZ et al., 2012; LEFEVRE et al., 2009; MEYDANI et al., 2016; MILLER et al., 2017; OTT et al., 2017; SMITH et al., 2019). Já é consenso que o consumo de dieta hiperlipídica deve ser evitado para prevenir o desenvolvimento da obesidade. Associado a esse fator, o consumo de dietas com baixo teor de gordura deve ser incentivado para alcançar benefícios metabólicos e na composição corporal potencializados em situações de obesidade (VANGOITSENHOVEN et al., 2018).

No nosso estudo, o grupo alimentado com dieta hiperlipídica que sofreu intervenção alimentar e, passou a consumir dieta padrão, reduziram de forma absoluta o consumo de gordura de 20% para 4.8%. Aqui, demonstramos que, após 4 e 8 semanas, a intervenção alimentar foi o fator mais importante no controle e na reversão dos efeitos deletérios causados pela obesidade na adiposidade visceral. Particularmente após 4 semanas de intervenção foram observadas que as principais alterações ocorreram em parâmetros de composição corporal e em menor magnitude nos parâmetros bioquímicos analisados. Especificamente, ocorreu redução nos tecidos adiposos (RET e MES), reduções na %GC, BA, MC, MGC, MLG, redução da glicemia, TG, HDL, leptina e aumento do FNDC5, além disso, foi observado o aumento na massa do gastrocnêmio. Após 8 semanas os efeitos da dieta foram ainda mais pronunciados e observamos redução de todos os depósitos viscerais, da %GC, BA, MC, MGC. Ainda foi observado o aumento na massa do pâncreas e gastrocnêmio, modulação de parâmetros bioquímicos e inflamatórios, como redução da glicemia, TG, IL-1 $\beta$ , leptina e, elevação do HDL. Foram também evidenciadas reduções no diâmetro dos adipócitos e lipídeos do fígado.

O aumento da massa do tecido adiposo marrom tem sido sugerida como estratégia contra obesidade e outras doenças metabólicas uma vez que a hiperplasia desse tecido está relacionada a ativação da sua funcionalidade (ALCALÁ et al., 2019; RODRIGUES et al., 2020). Em condições específicas o tecido adiposo marrom quando ativado induz a termogênese. Dentre os fatores de ativação do tecido adiposo marrom o estado nutricional também é um fator determinante. Isso porque o tecido adiposo marrom também tem apresentado relação inversa com o índice de massa

corporal, adiposidade visceral e pode explicar parcialmente os efeitos metabólicos negativos resultante da expansão do tecido adiposo visceral (BRENDLE et al., 2018; WANG et al., 2015). Estudos mais consistentes ainda mostram que a excisão do tecido adiposo marrom em roedores promove redução do gasto energético e aumenta a propensão a obesidade em resposta a oferta de dietas hiperlipídicas (LOWELL et al., 1993). Nesse sentido, nossa ideia inicial era de que os animais que alimentados com dieta padrão por exibirem redução da massa corporal e da adiposidade visceral, pudessem exibir maiores valores de tecido adiposo marrom, mas não foi o que observamos nesse estudo. Como mencionamos previamente já foi descrita a elevação da massa do tecido adiposo marrom em animais alimentados com dieta de cafeteria (ROTHWELL; STOCK, 1979), por um processo denominado como termogênese induzida por alimentos que acontece em resposta a oferta excessiva de nutrientes, em que o corpo aumenta o gasto energético para dissipar o excesso de calor. A dieta de cafeteria, por exemplo, parece induzir a uma atividade elevada do sistema nervoso simpático que resulta hiperplasia do tecido adiposo marrom (SAITO et al., 2020). É ainda importante destacar que o tecido adiposo marrom expressa proteínas que promovem melhorias na sensibilidade à insulina e tolerância a glicose (GREEN et al., 2020). Portanto, esperávamos que o grupo que teve reduzida a quantidade de gordura e que possui um fenótipo metabólico mais “favorável” apresentasse maiores valores na massa do tecido adiposo marrom, justificando o controle glicêmico apresentado. No entanto, nossos dados revelam que a melhora da captação da glicose, provavelmente não foi em função da atividade do tecido adiposo marrom.

Para investigar os efeitos da redução de gordura da dieta de animais obesos, avaliamos parâmetros de composição corporal e marcadores metabólicos associados a obesidade. Previamente foi reportado que o exercício e a composição da dieta afetam independentemente os parâmetros de adiposidade (VERHEGGEN et al., 2016). Smith et al. (2019) após 7 semanas de intervenção, verificaram que camundongos que passaram a consumir dieta padrão (18% de gordura), apresentaram menor massa corporal, percentual de gordura e massa de gordura em relação ao grupo HFD. Kazeminasab et al. (2018) reforçaram os achados ao mostrar que a redução de 35% da gordura por 8 semanas em camundongos obesos, promoveu redução do tecido adiposo branco e massa corporal. Um experimento similar as nossas condições mostrou que animais induzidos a obesidade (60% gordura) por 5 semanas que tiveram aumento do peso corporal, ao passaram a consumir a dieta padrão (10%) resultaram em valores normalizados da massa corporal,



similar ao período que antecedeu a indução da obesidade (SHANG et al., 2017). Nossos dados corroboram com as pesquisas anteriores e observamos que já na quarta semana, a massa corporal, o percentual de gordura corporal e a massa de gordura corporal estiveram reduzidos no grupo que retornou o consumo a dieta padrão e essa mesma resposta foi observada na oitava semana. Park et al. (2018) ainda mostraram que camundongos alimentados com 10% de gordura por 15 semanas, tiveram redução em 40% do peso dos animais em relação aos seus controles alimentados com 45% de gordura (PARK et al., 2018). Nos nossos animais CD-Sed foi possível observar uma significativa redução de 20% da massa corporal quando comparados ao grupo HFD-Sed após 4 semanas de intervenção. Após 8 semanas de intervenção nos animais CD-Sed foi possível observar uma significativa redução de 29% em comparação ao grupo HFD-Sed. Acreditamos que não alcançamos diferenças tão pronunciadas, porque a maioria dos estudos reduz de 35% a 50% o consumo de gordura ao propor uma intervenção dietética, porém nesse estudo reduzimos o consumo em 14.2% de gordura (20% HFD versus 4.8% CD). Em uma revisão sistemática, Verheggen et al. (2016) evidenciaram que dietas hipocalóricas resultam em maior perda de peso corporal quando comparadas ao treinamento físico. Como observado em nosso estudo e investigações anteriores, a dieta é um fator predominante na regulação do peso corporal, especialmente nas primeiras semanas (VERHEGGEN et al., 2016).

Para verificar se a redução de adiposidade foi acompanhada de redução dos depósitos viscerais, avaliamos a histologia dos adipócitos. Dados anteriores do nosso grupo, mostraram que em animais alimentados com a dieta padrão, após 6 semanas já foram observados valores reduzidos nos depósitos viscerais: epididimal, mesentérico e retroperitoneal quando comparados a animais alimentados com dieta hiperlipídica (OISHI et al., 2018). Ainda, camundongos induzidos a obesidade por 14 semanas (40% de gordura), após passar a consumir dieta padrão (10% de gordura) tiveram redução na massa dos adipócitos epididimais e perirrenais, além de redução na área de adipócitos epididimais (HOEVENAARS et al., 2014). Em consonância com achados prévios, nossos animais apresentaram reduções na massa dos depósitos viscerais após a intervenção dietética. Os depósitos retroperitoneais e mesentéricos evidenciaram respostas semelhantes frente a intervenção. Ambos os depósitos mostraram uma redução expressiva na massa do tecido adiposo mesentérico e retroperitoneais, com valores menores associados ao grupo submetido a intervenção dietética na quarta e na oitava semana. Já o tecido epididimal, mostrou redução apenas após 8

semanas de intervenção, e se assemelhou as diferenças encontradas em nos demais depósitos viscerais. Como observado no nosso estudo, o depósito epididimal registrou os maiores valores de massa, quando comparado aos depósitos do mesentérico e retroperitoneal. Apesar do tecido adiposo epididimal ser o depósito visceral que expressa mais mitocôndrias, lipolítico e ser mais inclinado ao gasto energético, ainda representa o estoque primário de gordura em roedores (DEVEAUD et al., 2004; SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018).

Diversos estudos na literatura investigaram a associação da expansão dos adipócitos frente a dieta hiperlipídica. Verboven et al. (2018) verificaram que em indivíduos obesos (IMC: 36,7 a 37,1 kg/m<sup>2</sup>) houve uma proporção significativamente maior de adipócitos viscerais grandes (70-89 ou < 90 µm) e uma proporção menor de adipócitos pequenos e médios (<50 ou 50-69 µm) quando comparados a indivíduos magros. Animais induzidos a obesidade por 14 semanas (60% de gordura) foram submetidos a um protocolo de redução no consumo de gorduras por 8 semanas através do consumo de dieta padrão (9% de gordura) e mostraram redução de ~2 vezes nos depósitos epididimais quando comparados aos animais obesos (VANGOITSENHOVEN et al., 2018). Hansson et al. (2019) mostraram que apenas 4 semanas de HFD (60% de gordura) promoveu aumento nos depósitos epididimal e retroperitoneal além da presença de adipócitos grandes e de maior diâmetro em animais HFD. O grupo que foi submetido a intervenção nutricional, e portanto passou a consumir dieta padrão, teve reversão dos efeitos em 2 semanas, expressas por redução no tamanho dos adipócitos e que ficaram semelhantes ao grupo padrão controle da pesquisa (HANSSON et al., 2019). Corroborando achados anteriores, os dados do presente estudo, mostraram que após as 8 semanas de intervenção, os depósitos viscerais: retroperitoneal e mesentérico, tiveram redução no diâmetro quando comparados a animais alimentados com dieta hiperlipídica. Já era esperada a redução do tamanho dos adipócitos em animais submetidos a intervenção dietética. Portanto, acreditamos que o tecido epididimal seja menos responsivo à ação da intervenção dietética. Ademais, os adipócitos retroperitoneais registraram os maiores valores de diâmetro e área e o tecido mesentérico registrou os menores valores. Esses dados não estão em consonância com o peso relativo dos tecidos, uma vez que o tecido adiposo epididimal apresentou maior massa. Essa afirmação reforça a importância da histologia do tecido adiposo para verificar as características específicas de cada depósito.

Os déficits de energia criados pelas intervenções dietéticas podem reduzir a síntese de proteína muscular e aumentar a proteólise, contribuindo para diminuição de massa corporal e massa muscular (BATSIS; VILLAREAL, 2018). Dados mais recentes ainda afirmam que da perda de massa corporal,  $\frac{3}{4}$  corresponde a perda de massa de gordura, enquanto  $\frac{1}{4}$  corresponde a perda de massa livre de gordura (LOMBARDO et al., 2017). Weiss et al. (2016) observaram que a modesta perda de peso ( $\sim 7\%$ ) induzida por  $\sim 20\%$  de restrição calórica diminuiu a massa e a força muscular (WEISS et al., 2016). No entanto, esses efeitos parecem ser mais observados em situações em que ocorre a restrição de calorias. No nosso estudo não houve restrição de calorias, apenas a alteração no macronutriente. Nesse tipo de intervenção, a massa muscular parece não se alterar. Smith et al. (2019) observaram que animais que passaram a consumir dieta padrão (18% de gordura) por 7 semanas não foi observada perda de massa de gordura e na massa livre de gordura significativa em relação a animais obesos. Palmer et al. (2012) mostraram que a massa magra mensurada através do DEXA foi elevada em animais obesos que passaram a consumir dieta padrão por 8 semanas. Corroborando os dados anteriores a intervenção dietética mostrou reduzir a massa livre de gordura. Observamos que interessante, a massa do gastrocnêmio foi alterada nos grupos. No grupo CD-Sed a massa do gastrocnêmio esteve elevada em relação aos animais HFD-Sed após as 4 semanas. A redução da massa muscular nesses animais pode ser resultante da obesidade sarcopênica (STENHOLM et al., 2008). Após as 8 semanas essa diferença foi novamente reportada. O sóleo e o EDL, no entanto, não sofreram ação direta da dieta exclusivamente.

Para avaliar se a melhoria na adiposidade visceral foi acompanhada por efeitos positivos nos marcadores bioquímicos e inflamatórios, investigamos essas variáveis no nosso estudo. A redução no consumo de gorduras está associada a melhorias no metabolismo da glicose e reduz eficientemente o risco de DM2 (HAMMAN et al., 2006; LEE; LONGO, 2016). Esses achados foram confirmados em animais obesos que passaram a consumir dieta padrão (18% de gordura) por 7 semanas, apresentaram valores reduzidos de insulina, glicose e HOMA-IR (SMITH et al., 2019). Animais alimentados com 10% de gordura por 15 semanas mostraram  $\sim 50\%$  menos glicemia circulante quando comparados aos animais alimentados com dieta hiperlipídica (PARK et al., 2018). Animais alimentados por 12 semanas com dieta de 11-13% de gordura mostraram redução da glicemia, redução da tolerância a glicose e redução da insulinemia, mostrando um perfil glicêmico favorável quando comparados a animais alimentados com dieta hiperlipídica (LANG et

al., 2019). Ainda, camundongos induzidos a obesidade por 14 semanas (40% de gordura), após passar a consumir dieta padrão (10% de gordura) por 5 semanas tiveram redução dos níveis séricos de insulina e no índice HOMA-IR, indicando uma melhora semelhante na homeostase da glicose, no entanto os níveis de glicose permaneceram inalterados (HOEVENAARS et al., 2014). Nossos dados corroboram de forma parcial com o exposto, embora nos nossos animais a glicemia, mostrou valores reduzidos após 4 e 8 semanas nos grupos submetidos a intervenção dietética, não foram observadas diferenças na secreção da insulina e no índice de HOMA-IR. Esses achados podem ser explicados pelo fato de que o consumo da dieta com reduzido teor de gordura nos nossos animais levou a melhora nos parâmetros de adiposidade visceral, o que promove melhor utilização da glicemia como substrato energético. Ademais, dietas hiperlipídica reduzem a expressão gênica de GLUT4 nos tecidos adiposo e muscular (COELHO et al., 2011), enquanto a intervenção dietética aumenta a expressão de GLUT-4 melhorando o metabolismo da glicose (PARK et al., 2005). Para apoiar nossos achados, também observamos que após 8 semanas, o pâncreas teve sua massa significativamente reduzida no grupo HFD-Sed quando comparado ao grupo CD-Sed, o que pode indicar apoptose das células  $\beta$  e prejudicar a secreção de insulina, dificultando a captação da glicose (RAHIER et al., 2008).

Grande parte dos efeitos negativos da obesidade são resultantes da instalação de uma inflamação crônica de baixo grau. Dessa forma as citocinas inflamatórias estão elevadas na obesidade como, por exemplo, a IL-1 $\beta$  (FAIN, 2006; KOENEN et al., 2011; PALOMERA et al., 2018; SHODA et al., 2017). A secreção dessas citocinas ocorre principalmente pela expansão não-saudável de adipócitos viscerais. Dessa forma, controlar a expansão do tecido adiposo visceral, deve ser crucial para evitar a inflamação. Nesse sentido, a redução da gordura visceral tem sido associada a redução dos marcadores inflamatórios. A expressão pancreática de IL-1 $\beta$  é induzida em altas concentrações de glicose, especialmente nas situações de obesidade (MAEDLER et al., 2002). Essa citocina tem efeito citotóxico levando ao comprometimento da secreção de insulina, diminuição da proliferação celular e apoptose das células beta pancreáticas (BENDTZEN et al., 1986; MAEDLER et al., 2002). Esses dados foram confirmados no cultivo de células adiposas. Gao et al. (2014) após superexpressarem a IL-1 $\beta$  mostraram que a sinalização insulínica foi suprimida em adipócitos. Subseqüentemente quando atividade da IL-1 $\beta$  foi bloqueada/inibida a houve a recuperação na expressão de genes envolvidos na sinalização insulínica, incluindo o

GLUT4, PPAR $\alpha$ , e PGC-1 $\beta$  (GAO et al., 2014). Nesse estudo a IL-1 $\beta$  foi reduzida em animais que tiveram consumo reduzido de gordura, mas apenas após 8 semanas. Nossos dados corroboram com os valores de glicemia reduzidos que também foram observados nesses animais. Ainda, esses resultados foram fortalecidos pelo aumento do peso do pâncreas observados em animais alimentados com dieta padrão, uma vez que peso o pâncreas foi significativamente reduzido no grupo HFD-Sed quando comparado ao CD-Sed, evidenciando um ambiente favorável a homeostase da glicemia. Para verificar se a intervenção dietética promoveu efeitos em outras adipocitocinas, foram avaliadas a IL-10 e leptina.

A IL-10 possui atividade anti-inflamatória e seus níveis estão reduzidos em obesos mórbidos, além de mostrarem uma forte correlação com um estado sistêmico de hiperinsulinemia e resistência à insulina (LEON-CABRERA et al., 2015). Kondo et al. (2018) ainda mostraram que em animais alimentados com dieta com baixo teor de gordura (20% de gordura versus 60% de gordura na HFD) por 12 semanas, expressaram elevados níveis de IL-10 em relação aos animais induzidos a obesidade e apresentaram reduzidos níveis de insulina e TNF- $\alpha$  (KONDO et al., 2018). Já foi reportado que anteriormente a IL-10 atua de forma positiva na sinalização insulínica em adipócitos suprimindo a expressão do TNF- $\alpha$  (STOLARCZYK, 2017). Ademais a IL-10 se mostrou capaz de suprimir a inflamação local e a ação deletéria de citocinas pró-inflamatórias no músculo esquelético (DAGDEVIREN et al., 2016). No entanto, observamos resultados diferentes nos nossos animais, a IL-10 não mostrou diferenças em relação a intervenção dietética, mas reforçamos que os nossos animais também não apresentaram diferenças na maioria dos marcadores inflamatórios, o que pode resultar na falta de diferenças entre os grupos analisados.

A leptina é responsável pela regulação energética (ZHANG et al., 1994) e é secretada em resposta ao aumento do consumo alimentar e adiposidade, inibindo o apetite, estimula a oxidação lipídica (MINOKOSHI et al., 2002). Embora em indivíduos não-obesos a leptina desempenha o papel de regulador da adiposidade prevenindo o acúmulo de gordura, em obesos a leptina parece estar mais elevada como resposta compensatória as disfunções metabólicas resultantes desse processo (GRUZDEVA et al., 2019; WOODS et al., 2000). Ainda, camundongos induzidos a obesidade por 14 semanas (40% de gordura), após passar a consumir dieta padrão (10% de gordura) tiveram redução na concentração de leptina circulantes em relação a animais alimentados com dieta hiperlipídica (HOEVENAARS et al., 2014). Em camundongos induzidos a obesidade por 6

semanas (45% de gordura) ao passarem a consumir dieta padrão (10% de gordura) foi observada redução na expressão proteica de leptina no tecido adiposo visceral, acompanhado de redução na massa corporal. Essa redução não foi significativa após 6 semanas, embora já existisse uma tendência para essa resposta, no entanto a redução significativa foi evidenciada após 12 semanas de intervenção (VIEIRA et al., 2009). Nossos achados mostraram que nos animais do grupo CD-Sed foram visualizados reduzidos valores de leptina, corroborando com a literatura e com os parâmetros de composição corporal evidenciados por esse estudo. No entanto, no nosso estudo já foi visualizada a redução a partir de 4 semanas de intervenção e que se manteve após 8 semanas, a diminuição de leptina também foi acompanhada de redução na adiposidade.

Em indivíduos obesos, a deposição ectópica de lipídeos no fígado causa o aumento na expressão de citocinas inflamatórias, que podem levar à fibrogênese hepática, reduzir os níveis de adiponectina e aumentar a lipotoxicidade e a morte de células hepáticas (MANNE; SAAB, 2014; QURESHI; ABRAMS, 2007). Dessa forma, a restrição no consumo de gorduras nesses indivíduos tem sido associado a melhora do acúmulo lipídico no fígado (LARSON-MEYER et al., 2008). Safari et al. (2019) mostraram que em animais induzidos a obesidade por 8 semanas, após 1 semana de retorno ao consumo de dieta padrão já foi visualizada redução nos triglicerídeos intra-hepáticos e esteatose hepática foram revertidas (SAFARI et al., 2019). Um experimento similar as nossas condições mostrou que em animais induzidos a obesidade (60% gordura) por 5 semanas, após retornarem ao consumo da dieta padrão por 2 semanas tiveram redução dos valores de triglicérides hepáticos (SHANG et al., 2017). Nossos achados, mostraram que após 4 e 8 semanas de intervenção dietética não foram visualizadas alterações na massa do fígado, nas células binucleadas e nem no conteúdo lipídico do fígado. Interessantemente, as vesículas de gordura presentes no fígado dos animais submetidos a intervenção dietética foram reduzidas tanto em animais submetidos a intervenção dietética, o que corrobora com os achados anteriores. Parte dos achados tem relação com a dislipidemia que faz parte das alterações resultantes da obesidade, com níveis aumentados de triglicerídeos e VLDL e, redução de HDL (GRUNDY, 2004; KLOP; ELTE; CABEZAS, 2013). Dessa forma avaliamos os efeitos da dieta nos animais desse estudo.

O HDL é um importante marcador do risco de doença arterial coronariana e sofre alterações frente a diferentes estados nutricionais (RASHID; GENEST, 2007; ROLLAND; BROOM, 2011). Cada redução de 5 mg/dl no colesterol HDL está associada a um risco elevado de

14% em eventos cardiovasculares (EBBERT; JENSEN, 2013). A obesidade modula de forma negativa os níveis de HDL e, portanto, as reduções estão associadas ao aumento da massa e gordura corporal (GRUNDY, 2004; KLOP; ELTE; CABEZAS, 2013). Dessa forma, específicas intervenções dietéticas objetiva elevar os valores de HDL, mantendo as funções fisiológicas da molécula (FORTI; DIAMENT, 2006). Em animais induzidos a obesidade por 8 semanas, ao passar a se alimentar com dieta padrão (4% de gordura) por 8 semanas, foi observado melhoria do perfil lipídico ao elevar as frações de HDL e reduzir a concentração de triglicerídeos (MA et al., 2015). Por outro lado, uma meta-análise mostrou que pessoas com sobrepeso/obesas após serem submetidas a intervenção dietética com baixo teor de gordura apresentaram redução do colesterol HDL em comparação com dietas com elevado teor de gordura (LU et al., 2018). No nosso estudo, os animais HFD-Sed apresentaram aumento dos valores de HDL em comparação ao grupo CD-Sed após 4 e 8 semanas. Como supracitado o aumento do HDL no grupo HFD-Sed pode ser explicado pois a gordura da dieta aumenta o transporte reverso de colesterol como um processo adaptativo (ROLLAND; BROOM, 2011). Ainda acreditamos que a dieta hiperlipídica de forma independente possa elevar os valores de HDL por possuir altas quantidades de vitamina E (ALMEIDA et al., 2012; JEON et al., 2005). Em relação aos triglicerídeos os dados do nosso estudo corroboram com estudos anteriores, uma vez que os triglicerídeos dos animais CD-Sed estiveram reduzidos após 4 e 8 semanas em relação ao grupo HFD-Sed. Chawla et al. (2020) também evidenciaram que dietas com restrição de gordura no geral são eficientes para promover perda de massa corporal, redução dos níveis de triglicerídeos e elevação dos valores de HDL (CHAWLA et al., 2020). E ainda pudemos observar que nos nossos animais do grupo CD-Sed a redução de aproximadamente 60% da gordura corporal após 8 semanas em relação aos animais HFD-Sed foi concomitantemente observada redução em 31% os valores de triglicerídeos.

A dieta alimentar desempenha um papel essencial na gênese da obesidade e da síndrome metabólica, mas a composição da dieta não parece interferir diretamente na secreção de irisina. Anastasilakis et al. (2014) mostraram que a ingestão calórica total ou macronutrientes: carboidratos, proteínas, gorduras e fibras não estão relacionadas à irisina (ANASTASILAKIS et al., 2014). Por outro lado, Varela-Rodríguez et al. (2016) evidenciaram que a restrição calórica reduziu o FNDC5 no músculo, enquanto permaneceu inalterado após a dieta com reduzido teor de gordura (VARELA-RODRÍGUEZ et al., 2016). Apesar disso, Macedo et al. (2017) demonstraram

que camundongos alimentados com dietas ricas em gordura (20% de gordura) e rica em carboidratos (80% de carboidratos) por 60 dias tiveram menos expressão de FNDC5/irisina no músculo sóleo quando comparados à dieta padrão e dieta rica em proteínas (31% proteína) (MACEDO et al., 2017). De forma contrária, nos nossos achados, a dieta exclusivamente não determinou as concentrações séricas de irisina nem a curto e nem a longo prazo. Porém a dieta com redução de gordura foi responsável por elevar a expressão proteica de FNDC5 no gastrocnêmio de animais do grupo CD-Sed em relação ao HFD-Sed. Como exposto previamente a massa do gastrocnêmio pode ter sido determinante para essa elevação. Portanto, é possível que a preservação da massa muscular tenha sido um dos fatores determinantes para a manutenção dos valores de FNDC5. Ademais, podemos associar esses valores elevados a composição corporal dos animais CD-Sed, uma vez que já foi demonstrada correlação negativa entre os níveis circulantes de irisina, IMC e a quantidade de tecido adiposo (FRÜHBECK et al., 2020; GRYGIEL-GÓRNIAK; PUSZCZEWICZ, 2017).

A literatura que versa sobre a associação de exercício, adiposidade visceral e dieta, mostrou que o exercício parece ser o fator determinante envolvido na regulação (VERHEGGEN et al., 2016). Dados mostraram que, o treinamento físico representava 6,1% do declínio da adiposidade visceral, enquanto a dieta representava apenas 1,1% da participação (DRENOWATZ et al., 2015; VERHEGGEN et al., 2016). Contrapondo esses resultados, nossos achados mostraram que a intervenção alimentar foi um fator determinante no controle e na reversão dos efeitos deletérios causados pela obesidade na adiposidade visceral. A curto prazo as principais alterações ocorreram em parâmetros de composição corporal e em menor escala nos marcadores bioquímicos e inflamatórios analisados. A longo prazo os efeitos da dieta foram ainda mais pronunciados na redução de todos os depósitos viscerais e melhoria na composição corporal, e em parâmetros bioquímicos e inflamatórios associados a obesidade. Ademais, os depósitos viscerais respondem de forma diferente a intervenção dietética, reforçando a necessidade de se avaliar as particularidades de cada tecido frente ao processo de emagrecimento. Nesse estudo, reafirmamos a importância da composição dos macronutrientes, especialmente da presença da gordura na dieta, que independente do consumo alimentar foi eficaz em atenuar os efeitos metabólicos e inflamatórios da obesidade.



### **5.2.2.3. Efeitos da combinação do treinamento físico e intervenção dietética dieta em modelos animais induzidos a obesidade**

No nosso estudo, o grupo submetido a intervenção dietética associada ao exercício mostrou que em 4 semanas, houve redução do TAM e dos depósitos viscerais (RET e MES), %GC e MGC. Ainda foram notadas alterações nos parâmetros metabólicos (glicemia, HDL, TG, HOMA, IL-1 $\beta$  e leptina). Após 8 semanas os efeitos da intervenção na sua maioria se mantiveram, mais especificamente a redução do TAM e dos depósitos viscerais (EPI, RET e MES), %GC, MC, AC e MGC. Ainda foram notadas alterações positivas nos parâmetros metabólicos (glicemia, IL-1 $\beta$  e leptina) e no músculo sóleo. E as alterações nos depósitos viscerais foram acompanhadas na redução das áreas e diâmetros dos adipócitos (EPI, RET e MES) e redução das vesículas de gordura do fígado. Ademais, a irisina/FNDC5 não foram alterados frente a associação de intervenção dietética e exercício.

Observamos que a combinação de dieta e exercício promoveu a redução do tecido adiposo marrom tanto a curto como a longo prazo. Uma possível explicação para os achados se deve a regulação do gasto energético. As mudanças na massa e composição corporal são fatores determinantes no gasto energético (FONSECA et al., 2018; WESTERTERP, 2017). Nesse sentido, já foi observado que indivíduos obesos apresentam um maior gasto energético total, uma vez que a energia solicitada para a movimentação de uma massa corporal maior é mais elevada (FONSECA et al., 2018; WESTERTERP, 2018). Ademais, a redução de 10 a 20% massa corporal de indivíduos obesos frente a restrição energética reduzem o gasto energético em aproximadamente 3 a 6% (WESTERTERP, 2017). Esses achados podem sugerir que o aumento na demanda energética em animais obesos quando sedentários, também podem promover o aumento na massa do tecido adiposo marrom. Em conjunto com esses fatores, e considerando que o exercício resulta no aumento de temperatura corporal e portanto, acredita-se que o tecido adiposo marrom tem uma função mais hipoativa durante o exercício físico (DEWAL; STANFORD, 2019; WU et al., 2014). Portanto, de forma intuitiva já seria esperado que a redução da massa corporal associada ao exercício pudesse contribuir para a função reduzida do tecido adiposo marrom com consequente redução da massa.

O exercício físico não é exclusivamente um método eficaz para regular a massa corporal, mas é um fator importante na manutenção quando combinado à intervenção dietética (VERHEGGEN et al., 2016). A redução de 5% na massa corporal está associada a uma diminuição de 21,3% no tecido adiposo visceral após o treinamento físico e, a uma redução de 13,4% após uma dieta hipocalórica (VERHEGGEN et al., 2016). Portanto seria esperado que a combinação dessas intervenções pudesse potencializar os efeitos visualizados de forma isolada. Dessa forma, foi observado que a combinação da intervenção dietética e exercício provocam maiores reduções na massa corporal na gordura corporal subcutânea mas não na intra-abdominal, quando comparada exclusivamente com a intervenção dietética (VAN GEMERT et al., 2019). Vieira et al. (2009) ao submeterem animais obesos a 6 e 12 semanas de dieta hipocalórica (10% de gordura) e exercício de moderada intensidade (5x/semana, 40 minutos) mostraram que a massa corporal foi reduzida no grupo dieta controle e exercitado em relação ao grupo obeso e sedentário após 6 e 12 semanas. Cui et al. (2013) observaram redução na massa corporal de animais obesos, quando estes passaram a consumir dieta padrão (5% de gordura) e realizarem esteira por (30 min, 5x/semana) por 6 semanas, quando comparados aos animais obesos e sedentários. Palmer et al. (2012) comprovaram redução na massa de gordura de animais obesos, após consumirem dieta padrão (6% de gordura) em associação com a natação (30 min, 5x/semana) por 8 semanas, especialmente dos depósitos viscerais epididimal e retroperitoneal. Nossos achados estão de acordo com os dados prévios. A massa corporal foi alterada pela combinação de intervenções apenas após 8 semanas. Com valores reduzidos atribuídos ao grupo CD-Ex quando comparados ao HFD-Sed, mas os valores não diferiram de CD-Sed.

As mudanças na massa corporal também foram acompanhadas por alterações nos parâmetros de adiposidade (redução do percentual de gordura e massa de gordura) e depósitos viscerais. O tecido adiposo epididimal apresentou redução, apenas após 8 semanas da combinação de dieta e exercício. Os demais depósitos viscerais, retroperitoneal e mesentérico tiveram comportamento similar e apresentaram redução desde a quarta semana no CD-Ex em relação ao HFD-Sed e permaneceram reduzidos até a oitava semana.

Como mencionado, o epididimal é o depósito visceral mais sensível ao gasto energético mas ainda representa o estoque primordial de gordura e contém adipócitos maiores (DEVEAUD et al., 2004; SCHOETTL; FISCHER; USSAR, 2018). No nosso estudo, o epididimal registrou os

maiores valores de massa, quando comparado aos depósitos retroperitoneal e mesentérico. Acreditamos, portanto, que frente a combinação de dieta e exercício, a resposta também foi mais tardia, uma vez que o CD-Ex somente foi significativamente diferente do HFD-Sed após 8 semanas. Nossos achados corroboram com resultados expostos previamente em que os depósitos epididimais responderam após 6 e 12 semanas de intervenção, com reduzidos valores atribuídos ao grupo submetido ao exercício e intervenção dietética (VIEIRA et al., 2009). A combinação da intervenção dietética associada ao treinamento, ainda mostrou reduzir as áreas dos três depósitos viscerais, além da redução dos diâmetros. Novamente, os valores registrados no grupo alimentado com dieta padrão e exercitado, mostraram valores reduzidos em relação ao grupo obeso sedentário.

No grupo alimentado com dieta padrão em associação ao exercício físico (CD-Ex) foi observada a maior frequência de adipócitos menores em todos os depósitos viscerais. Ainda, a maior frequência de adipócitos  $< 2000 \mu\text{m}^2$  foi verificado no tecido mesentérico, o que mostra que talvez esse tecido seja o principal depósito a ter os adipócitos reduzidos quando submetidos a intervenção dietética e exercício. De forma oposta nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e sedentários expressaram maior frequência de adipócitos maiores que  $5000 \mu\text{m}^2$ . A maior frequência dos adipócitos maiores foi verificada no tecido retroperitoneal. Nossos achados corroboram com resultados anteriores. Achados recentes, mostraram que em animais induzidos a obesidade por 7 semanas (45% de gordura) a hipertrofia foi comprovada por aumento do diâmetro celular dos depósitos retroperitoneal e epididimal e redução do volume citosólico (WANG et al., 2017). Poret et al. (2018) observaram que 7 semanas de dieta hiperlipídica (60% de gordura), promoveu aumento no peso relativo e na área de depósitos viscerais. Adipócitos menores ( $1000$  a  $2000 \mu\text{m}^2$ ) foram observados em ratos resistentes a obesidade e adipócitos maiores ( $5000$  a  $10\ 000 \mu\text{m}^2$ ) foram evidenciados em animais inclinados a desenvolver a obesidade (PORET et al., 2018). Achados por Gao, Ma e Liu (2015) mostraram que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (60% de gordura) tiveram aumento do diâmetro dos adipócitos a partir da quarta semana em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Dados de Avtanski et al. (2019) ainda mostraram que em camundongos alimentados com 60% de dieta hiperlipídica, houve um aumento na área de depósitos epididimais, mesentéricos e retroperitoneal. Esse estudo ainda trouxe que o aumento de 20% da circunferência abdominal que foi diretamente relacionado a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos (AVTANSKI et al., 2019).

No geral, células hipertróficas são consideradas desfavoráveis ao metabolismo pois estão associadas a condições patológicas como a presença da resistência insulínica e maior secreção de fatores inflamatórios (STENKULA; ERLANSON-ALBERTSSON, 2018). A afirmação foi reforçada por Muir et al. (2017) que mostraram que adipócitos grandes ( $\sim 5,600\text{--}8,700\ \mu\text{M}^2$ ) tem maior frequência do que adipócitos menores em indivíduos diabéticos, sugerindo um desequilíbrio entre a hipertrofia dos adipócitos e a hiperplasia dos pré-adipócitos contribuindo para a patogênese do diabetes na obesidade (MUIR et al., 2017). Por outro lado a hiperplasia do tecido adiposo parece ser um mecanismo adaptativo a hipertrofia (LONGO et al., 2019). Esses adipócitos possuem características particulares que favorecem a vascularização adequada ao tecido, tem reduzida a expressão citocinas anti-inflamatórias, e tem preservada a sensibilidade à ação da insulina (CHOE et al., 2016; GHABEN; SCHERER, 2019; LONGO et al., 2019). Esses achados sugerem que a associação da redução da gordura ofertada na dieta em associação com o treinamento físico, são efetivos em reduzir o número de adipócitos hipertróficos, quadro geralmente visualizado na situação de obesidade e sedentarismo.

A restrição de energia leva a redução da massa corporal e massa livre de gordura como supracitado, porém quando a intervenção dietética é associada ao exercício existe uma perda atenuada da massa livre de gordura. Achados mostraram que o exercício físico combinado a dieta reduz a massa muscular de 24% (com a intervenção da dieta exclusiva) para aproximadamente 11%, quando combinadas (WEINHEIMER; SANDS; CAMPBELLNURE, 2010). Palmer et al. (2012) também mostraram que após animais obesos consumirem dieta padrão (6% de gordura) em associação com a natação (30 min, 5x/semana) por 8 semanas, houve um aumento na massa muscular. Como mencionamos, o exercício de forma isolada promoveu nas situações de obesidade aumento da massa muscular apenas em grupos musculares específicos. Dessa forma, esperávamos que a combinação de dieta e exercício, pudesse preservar a massa muscular dos tecidos avaliados nesse estudo e esses dados foram parcialmente comprovados. Nossos achados não evidenciaram diferenças significativas na massa livre de gordura e nos grupamentos musculares avaliados frente a associação de dieta e exercício, no entanto também não foi observada redução da massa muscular dos animais submetidos a ambas as intervenções.

Em relação as alterações bioquímicas frente a combinação de dieta e exercício, diversos achados foram reportados. Kristensen et al. (2017) em indivíduos obesos após 15 semanas de dieta

hipocalórica e exercícios de intensidade moderada não evidenciaram diferenças significativas entre a insulina e glicose plasmática frente as intervenções. Vieira et al. (2009) observaram que animais que combinaram dieta hipocalórica e esteira de moderada intensidade após 6 e 12 semanas, as intervenções seja na forma isolada ou associadas foram igualmente eficazes para melhorar o índice HOMA-IR, isso pode ter sido atribuído a redução da adiposidade corporal. Ainda, animais que foram induzidos a obesidade por 8 semanas e posteriormente, foram submetidos a intervenção dietética combinadas com o exercício (natação-5x/semana -90 min) por mais 4 semanas, foi evidenciada redução da glicemia, insulina, acompanhando redução da massa corporal e da adiposidade corporal (SUGA et al., 2014). Nossos achados corroboram com achados prévios e mostramos que a combinação da intervenção dietética e exercícios promoveu a redução da glicemia a curto e a longo prazo, acompanhado de valores reduzidos na composição corporal. Os menores valores foram exibidos pelo grupo que combinou ambas as intervenções, porém sem diferença do grupo que foi submetido apenas a intervenção dietética. No entanto, as concentrações de insulina não foram alteradas. Ademais, o índice HOMA-IR, mostrou significativa redução após ambas as intervenções, sugerindo um possível aumento da sensibilidade à insulina pelos tecidos promovendo adequado metabolismo da glicose, mas somente a curto prazo. Os valores observados no grupo que associou intervenção dietética e exercício foram os menores valores reportado dentre os grupos, o que mostra que a associação das intervenções potencializou os efeitos na sensibilidade à insulina. Um estudo conduzido por Galedari, Azarbayjani e Peeri (2017) também reportaram os mesmos resultados em homens obesos após 12 semanas de intervenção dietética (25-30% de gordura) associados a caminhada (50-55% da  $V_{máx}$ ). O estudo ainda mostrou que todos os tipos de exercícios, seja na forma resistida, aeróbica ou na combinação das duas modalidades, o índice de HOMA-IR foi melhorado (GALEDARI; AZARBAYJANI; PEERI, 2017). A melhora na captação da glicose pode ser oriunda da preservação da funcionalidade do pâncreas que embora não tenha mostrado aumento significativo em relação ao grupo obeso, mostrou uma tendência para o aumento na massa após 8 semanas em animais que associaram as duas intervenções. Como descrito por Golbidi et al. (2017) a ingestão reduzida de energia reduz a apoptose das células pancreáticas e atenua a beta apoptose celular em ratos diabéticos promovendo aumento da sensibilidade à insulina pelos tecidos.

Em relação ao metabolismo lipídico, Kristensen et al. (2017) evidenciaram redução das frações lipídicas de colesterol total, HDL em indivíduos obesos após 15 semanas de dieta hipocalórica e exercícios de intensidade moderada, sem alterações nos triglicerídeos e LDL (KRISTENSEN et al., 2017). Cui et al. (2013) após dieta hipocalórica e esteira por 6 semanas, observaram reduzidos valores de triglicerídeos, colesterol total, LDL e HDL em animais alimentados com dieta padrão e exercitados. E Suga et al. (2014) mostraram redução dos triglicerídeos e colesterol total em animais obesos que foram submetidos a intervenção dietética por 4 semanas (natação-5x/semana-90 minutos). Como esperado, após visualizar os resultados anteriores do nosso estudo, novamente observamos que o HDL foi elevado no grupo HFD-Sed na quarta e na oitava semana em relação ao grupo submetido a ambas intervenções, o que pode significar um mecanismo compensatório de transição. Os valores dos triglicerídeos estiveram alterados após 4 semanas com aumento no grupo HFD-Sed e redução no grupo submetido a ambas intervenções.

O acúmulo excessivo de triglicerídeos provoca a deposição ectópica de lipídeos no fígado e causa o aumento na expressão de citocinas inflamatórias (MANNE; SAAB, 2014; QURESHI; ABRAMS, 2007). Palmer et al. (2012) após animais obesos consumirem dieta padrão (6%) em associação com a natação (30 min, 5x/semana) por 8 semanas não observaram alterações na massa do fígado. Nossos achados corroboram com o exposto anterior, uma vez que não observamos alteração no peso do fígado após as intervenções. No entanto, de forma independente da massa do tecido hepático a avaliação na morfometria mostrou que a dieta padrão em associação com o treinamento promovem redução dessas vesículas, corroborando com achados anteriores. Após a combinação de exercícios regulares e intervenção de mudança dietética, entretanto, a síntese de gordura diminuiu e, a oxidação beta dos ácidos graxos aumentou, além de observar redução da expressão de proteínas relacionadas a acumulação lipídica (OK; KO; BAE, 2018). Ainda, já foi observado que o consumo de 10% de gordura associados ao treinamento em esteira (5x/semana, 60–65% da  $V_{máx}$ ) por 8 semanas promoveu a redução no peso do fígado e redução da área dos lipídeos hepáticos em relação a animais alimentados com dieta hiperlipídica sedentários (60% de gordura) (LA FUENTE et al., 2019). Vieira et al. (2009) observaram redução dos triglicerídeos hepáticos em animais que combinaram dieta hipocalórica e esteira de moderada intensidade, após 6 e 12 semanas. Nossos dados reforçaram os achados anteriores e aqui, mostramos que no tecido

hepático, a presença de gordura foi reduzida frente ao consumo de dieta padrão combinada com o exercício físico. Nossos resultados sugerem que avaliar somente o peso do fígado não é suficiente para inferir alterações na morfometria hepática, especialmente no que concerne a deposição de lipídeos.

Em indivíduos alimentados com dieta hipocalórica e uma combinação de exercícios aeróbicos e resistidos por 8 semanas em indivíduos obesos a leptina plasmática foi significativamente reduzida no grupo que associou ambas as intervenções do que no grupo que apenas utilizou a dieta de forma exclusiva. As mudanças no nível de leptina plasmática foram associadas a mudanças de massa corporal durante 8 semanas de intervenção (LUGLIO et al., 2017). Cui et al. (2013) após a combinação de dieta e exercício por 6 semanas observaram redução na concentração de leptina. Nossos dados corroboram com o exposto anterior e verificamos que as concentrações séricas de leptina estiveram reduzidas no grupo que associou intervenção dietética e exercício, em comparação ao grupo obeso sedentário após 4 e 8 semanas. É importante notar que o grupo obeso sedentário que registrou os maiores valores de leptina após 8 semanas e adiposidade visceral, podem indicar a manifestação do processo de resistência à ação da leptina compatível com o fenótipo metabólico comumente observado em obesos (GRUZDEVA et al., 2019; WOODS et al., 2000).

Dentre os demais marcadores metabólicos, a associação de dieta hipocalórica com exercício de moderada intensidade por 15 semanas em indivíduos severamente obesos, mostrou redução de marcadores inflamatórios no plasma e no tecido adiposo, como PCR, IL-6, IL-8 e MCP-1 e aumento de proteínas anti-inflamatórias, como a adiponectina (BRUUN et al., 2006). Os resultados foram decorrentes da redução do número de macrófagos do tecido adiposo, uma vez que a infiltração de macrófagos no músculo esquelético não foi significativa (BRUUN et al., 2006). Uma revisão mostrou que a maioria dos estudos que realizam a combinação de dieta associados ao exercício físico induzem a uma perda de massa corporal significativa e redução de marcadores inflamatórios (FORSYTHE; WALLACE; LIVINGSTONE, 2008). No entanto foi notado que a redução do peso de pelo menos 10% resultou em melhorias nas concentrações de marcadores inflamatórios relacionados a obesidade. Enquanto em estudos em que a perda de peso foi inferior a 10% mostraram que os efeitos no marcadores inflamatórios não produziram resultados tão consistentes (FORSYTHE; WALLACE; LIVINGSTONE, 2008). No presente estudo nossos

animais tiveram redução de aproximadamente 5% da massa corporal após 4 semanas de intervenção. E já conseguimos visualizar alterações a curto prazo na leptina e na IL-1 $\beta$ . Esses resultados foram também visualizados após as 8 semanas de intervenção, em que a redução da massa corporal foi de 27%, o que reflete essas alterações. No entanto não foram visualizadas alterações na IL-10. Porém é importante ressaltar que a IL-10 não foi alterada frente a nenhuma intervenção. Embora a redução de 10% da massa corporal proporcione efeitos positivos na modulação de marcadores inflamatórios, acreditamos que especificamente em relação a IL-10 esse percentual de redução na massa corporal, deva ser ainda maior.

Resultados contraditórios têm sido apresentados na literatura, já foi demonstrado que o exercício pode modular as concentrações de irisina/FNDC5 de forma dependente das condições de treinamento (ARHIRE; MIHALACHE; COVASA, 2019). Já a composição da dieta e a ingestão calórica parecem não interferir diretamente na secreção de irisina (ANASTASILAKIS et al., 2014). Nesse estudo observamos que o exercício de forma isolada reduziu os valores de irisina e a dieta hiperlipídica exclusivamente contribui para reduzir a expressão de FNDC5, mas somente na condição de sedentarismo. Portanto esperávamos que a combinação da intervenção dietética e exercício pudesse produzir algum efeito na secreção dessa miocina. Kazeminasab et al. (2018) mostraram que em animais previamente induzidos a obesidade (45% de gordura), ao consumir 10% de gordura associados ao treinamento em esteira por 45 minutos (5x/semana), a combinação de dieta e exercício não produziu efeito no mRNA *Fndc5* de adipócitos viscerais. No entanto, no músculo gastrocnêmio, foi observado que os níveis da proteína FNDC5 e os níveis de mRNA *Fndc5* sofreram efeito da dieta e do exercício. Maiores valores da proteína FNDC5 foram registrados nos animais submetidos as duas intervenções, sendo maiores que nos animais sedentários obesos. Já os níveis de mRNA *Fndc5* no gastrocnêmio foram menores nos animais submetidos as intervenções. Ainda os valores de irisina circulantes foram elevados no grupo alimentado com dieta hiperlipídica e sedentário quando comparado ao grupo alimentado com dieta padrão e exercitado. Nossos achados mostraram que após 4 e 8 semanas de combinação de intervenção dietética e exercício não promoveu efeito sobre as concentrações de irisina ou sobre a expressão da proteína FNDC5 no gastrocnêmio. Já foi observada que a associação de dieta padrão com o protocolo de natação (30 minutos- 5x/semana) o nível de irisina sérica foi significativamente maior em relação ao grupo dieta hiperlipídica sedentário após 24 semanas (LU et al., 2016).



Semelhantes resultados foram evidenciados em animais alimentados com dieta padrão submetidos ao protocolo de natação (60 minutos- 5x/semana) por 20 semanas o nível de irisina sérica foi significativamente maior em relação ao grupo dieta hiperlipídica sedentário (BADAWY et al., 2020). Alguns fatores podem ter contribuído para não observarmos o aumento de irisina/FNDC5 nos nossos animais, dentre eles, a frequência semanal utilizada no nosso estudo foi menor do que a previamente observada e devido a esse fator talvez fosse necessária maior duração do protocolo de treinamento.

O presente estudo fornece evidências de que a combinação de treinamento aeróbico e dieta tendem a resultar em uma maior diminuição da adiposidade visceral e acentuar os efeitos promovidos pela dieta e exercício. No nosso estudo, o sóleo foi o único que sofreu alteração frente a combinação das duas intervenções. Portanto, reforçamos a importância da combinação da dieta associada ao exercício no controle da obesidade, especialmente na preservação da massa muscular. No entanto, os efeitos do exercício de forma isolada continuam sendo superiores a combinação de dieta e exercício. É importante reforçar que embora os parâmetros relacionados a adiposidade e metabolismo no grupo combinação entre intervenção dietética e exercício tenham sido melhorados, em sua maioria não foi diferente do grupo somente com intervenção dietética exclusiva. O que sugere que essa diferença pode ser mais associada a alteração da dieta do que necessariamente da combinação entre intervenção dietética e exercício. No entanto, sem dúvidas, com o acréscimo do exercício existe uma tendência para que todos os parâmetros relacionados a obesidade sejam melhorados, uma vez que no geral parâmetros de composição corporal, adiposidade e marcadores inflamatórios parecem ser melhorados no grupo submetido a intervenção dietética e exercício. Ainda essa combinação foi efetiva em modular tanto parâmetros antropométricos e relacionados a adiposidade visceral quanto bioquímicos, mas foram similares as alterações proporcionadas pela dieta de forma exclusiva.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Reproduzir as condições humanas em experimentos com animais é necessário para que possa compreender melhor as respostas humanas frente a distúrbios fisiológicos. Dessa forma, reforçamos que o uso da dieta hiperlipídica com palatabilidade promove aumento da adiposidade, composição corporal e disfunções metabólicas que se aproximam do fenótipo obeso de seres humanos. No entanto para promover alterações bioquímicas significativas e instalar um quadro compatível com a inflamação crônica de baixo grau é necessária a exposição da dieta por mais que 8 semanas.

Pensando nisso, as condições metabólicas adversas devem ser levadas em consideração ao prescrever um programa de treinamento físico e intervenção dietética, especialmente porque o planejamento e o objetivo em cada condição também são diferentes. Aqui, reportamos que em indivíduos obesos, o alvo das intervenções deve ser a redução da adiposidade visceral, de forma preservar a função saudável do tecido adiposo. Nesse sentido, ressaltamos que não existe melhor intervenção, mas sim é importante identificar os alvos terapêuticos que são potencializados por cada intervenção. As modificações proporcionadas pela intervenção dietética de forma exclusiva interferem de forma mais precoce e em maior escala em parâmetros de composição corporal e antropométricos. É importante pontuar que nesse estudo não realizamos restrição calórica ou reduzimos de forma extenuante os macronutrientes da dieta. Ainda assim evidenciamos efeitos positivos na adiposidade e metabolismo. Dessa forma, dietas altamente restritivas ou alterações bruscas no padrão de alimentação podem descontinuar a aderência a intervenção. Portanto sugerimos que a abordagem adotada neste estudo, possa ser utilizada como estratégia inicial para a intervenção nutricional.

Por outro lado, o exercício tem eficácia de forma mais precoce nos parâmetros metabólicos e na massa muscular. Já na forma crônica exerce efeitos mais significativos na adiposidade visceral. Destacamos que os efeitos cumulativos do treinamento são importantes não só para preservar a musculatura que promove ações corretivas fisiológicas no organismo, devido a função secretora, como para evitar a obesidade sarcopênica. Nesse sentido, o protocolo de treinamento nesse estudo, não mostrou elevar os níveis de irisina/Fndc5, mas reduziu esses valores em animais padrão exercitados, o que mostra a necessidade de um programa mais duradouro e com

maior frequência semanal para atuar efetivamente nessa miocina e proporcionar os efeitos pleiotrópicos propostos inicialmente. No entanto, reforçamos que a irisina possa ser utilizado como um marcador bioquímico precoce na obesidade e o FNDC5 também pode ser utilizado na identificação de obesidade sarcopênica.

Ainda observamos que a combinação da dieta e exercício, ao contrário do que foi hipotetizado não potencializou todos os efeitos relacionados a adiposidade visceral de cada intervenção, mas existe uma tendência para esse aumento. Portanto, reforçamos a importância da combinação da dieta associada ao exercício no controle da obesidade, especialmente em parâmetros relacionados a composição corporal. É importante reforçar que as alterações podem estar mais associadas a alteração da dieta do que necessariamente da combinação entre dieta e exercício.

## 7 REFERÊNCIAS

- AARNIO, P.; LAURITSEN, T.; DELA, F. Insulin Secretion and Glucose Kinetics during Exercise with and Without Pharmacological  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-Receptor Blockade. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1834–1843, 2001.
- ACEVEDO, L. M. et al. Obesity-induced discrepancy between contractile and metabolic phenotypes in slow- and fast-twitch skeletal muscles of female obese Zucker rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 123, n. 1, p. 249–259, 2017.
- AHMADIAN, M. et al. PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future. **Nature medicine**, v. 19, n. 5, p. 1–21, 2013.
- AL-DAGHRI, N. M. et al. Irisin as a predictor of glucose metabolism in children: Sexually dimorphic effects. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 44, n. 2, p. 119–124, 2014.
- ALARCON, C. et al. Pancreatic  $\beta$ -cell adaptive plasticity in obesity increases insulin production but adversely affects secretory function. **Diabetes**, v. 65, n. 2, p. 438–450, 2016.
- ALCALÁ, M. et al. Mechanisms of impaired brown adipose tissue recruitment in obesity. **Frontiers in Physiology**, v. 10, p. 1–10, 2019.
- ALEX, S. et al. Exercise training improves liver steatosis in mice. **Nutrition and Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2015.
- ALMEIDA, D. A. T. et al. Evaluation of lipid profile and oxidative stress in STZ-induced rats treated with antioxidant vitamin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 527–536, 2012.
- ALZAMIL, H. Elevated Serum TNF-  $\alpha$  Is Related to Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus and Is Associated with Glycemic Control and Insulin Resistance. **Journal of Obesity**, v. 2020, p. 5–9, 2020.
- ANASTASILAKIS, A. D. et al. Circulating irisin in healthy, young individuals: Day-night rhythm, effects of food intake and exercise, and associations with gender, physical activity, diet, and body composition. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 9, p. 3247–3255, 2014.
- ANDERSEN, C. J.; MURPHY, K. E.; FERNANDEZ, M. L. Impact of obesity and metabolic syndrome on immunity. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 66–75, 2016.
- ARD, J. D.; MILLER, G.; KAHAN, S. Nutrition Interventions for Obesity. **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 6, p. 1341–1356, 2016.
- ARHIRE, L. I.; MIHALACHE, L.; COVASA, M. Irisin: A Hope in Understanding and Managing Obesity and Metabolic Syndrome. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 1–12, 2019.
- ARMAMENTO-VILLAREAL, R. et al. Fat, Muscle, and Bone Interactions in Obesity and the Metabolic Syndrome. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–3, 2014.
- AVTANSKI, D. et al. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 2, n. 4, p. 252–258, 2019.
- AYDIN, S. et al. Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses to with or without water exercise in young and old male rats: Cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. **Peptides**, v. 52, p. 68–73, 2014.
- BADAWY, E. et al. Role of swimming on muscle PGC-1 $\alpha$ , FNDC5 mRNA, and assessment of serum

omentin, adropin, and irisin in high carbohydrate high fat (HCHF) diet induced obesity in rats. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2020.

BAE, J. Y. et al. The effects of detraining and training on adipose tissue lipid droplet in obese mice after chronic high-fat diet. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2017.

BAEK, K. W. et al. Effects of regular-moderate exercise on high-fat diet-induced intramyocellular lipid accumulation in the soleus muscle of Sprague-Dawley rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 14, n. 1, p. 32–38, 2018.

BARRY, J. C. et al. Short-term exercise training reduces anti-inflammatory action of interleukin-10 in adults with obesity. **Cytokine**, v. 111, p. 460–469, 2018.

BASTU, E. et al. Effects of Irisin and Exercise on Metabolic Parameters and Reproductive Hormone Levels in High-Fat Diet-Induced Obese Female Mice. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 2, p. 281–291, 2018.

BATSIS, J. A.; VILLAREAL, D. T. Sarcopenic obesity in older adults: aetiology, epidemiology and treatment strategies. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 9, p. 513–537, 2018.

BENDTZEN, K. et al. Cytotoxicity of human pI 7 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. **Science**, v. 232, n. 4757, p. 1545–7, 1986.

BERRY, D. C. et al. The developmental origins of adipose tissue. **Development (Cambridge)**, v. 140, n. 19, p. 3939–3949, 2013.

BING, C. Is interleukin-1 $\beta$  a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? **Adipocyte**, v. 4, n. 2, p. 149–152, 2015.

BIRD, S. R.; HAWLEY, J. A. Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. **BMJ Open Sport and Exercise Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1–26, 2017.

BJØRNDAL, B. et al. Different adipose depots: Their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. **Journal of Obesity**, v. 2011, p. 15, 2011.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019.

BOSTRÖM, P. et al. A PGC1 $\alpha$  dependent myokine that derives browning of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463–468, 2012.

BOUASSIDA, A. et al. Leptin, its implication in physical exercise and training: a short review. **Journal of sports science & medicine**, v. 5, n. 2, p. 172–81, 2006.

BRADLEY, H. et al. Visualization and quantitation of GLUT4 translocation in human skeletal muscle following glucose ingestion and exercise. **Physiological Reports**, v. 3, n. 5, p. 1–11, 2015.

BRAY, G. A. et al. Management of obesity. **The Lancet**, v. 387, n. 10031, p. 1947–1956, 2016.

BRENDLE, C. et al. Correlation of Brown Adipose Tissue with Other Body Fat Compartments and Patient Characteristics: A Retrospective Analysis in a Large Patient Cohort Using PET/CT. **Academic Radiology**, v. 25, n. 1, p. 102–110, 2018.

BROOKS, G. A.; WHITE, P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology.**, v. 45, n. 6, p. 1009–15, 1978.

BRUM, P. C. et al. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Rev Paul**

**Educ Fís**, v. 18, p. 21–31, 2004.

BRUUN, J. M. et al. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 5, p. 961–967, 2006.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798–808, 2007.

CALDERON-DOMINGUEZ, M. et al. Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. **Adipocyte**, v. 5, n. 2, p. 98–118, 2016.

CALEGARI, L. et al. Exercise training improves the IL-10/TNF- $\alpha$  cytokine balance in the gastrocnemius of rats with heart failure. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 22, n. 2, p. 154–160, 2018.

CAMACHO, R. C. et al. Glucoregulation during and after exercise in health and insulin-dependent diabetes. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 33, n. 1, p. 17–23, 2005.

CAMPOS, R. M. DA S. et al. Effects of magnitude of visceral adipose tissue reduction: Impact on insulin resistance, hyperleptinemia and cardiometabolic risk in adolescents with obesity after long-term weight-loss therapy. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 16, n. 2, p. 196–206, 2019.

CANNON, B. et al. Human brown adipose tissue: Classical brown rather than brite/beige? **Experimental Physiology**, v. 105, n. 8, p. 1191–1200, 2020.

CANNON, B.; HOUSTEK, J.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: More than an effector of Thermogenesis? **Annals New York Academy of Sciences**, v. 856, p. 171–187, 1998.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.

CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2011.

CARLIN, J. et al. Removal of high fat diet after chronic exposure drives binge behavior and dopaminergic dysregulation in female mice. **Neuroscience**, v. 326, p. 170–179, 2016.

CARO, J. F. et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: A possible mechanism for leptin resistance. **Lancet**, v. 348, n. 9021, p. 159–161, 1996.

CASTILLO-QUAN, J. I. From white to brown fat through the PGC-1 $\alpha$ -dependent myokine irisin: Implications for diabetes and obesity. **Disease Models and Mechanisms**, v. 5, n. 3, p. 293–295, 2012.

CATTA-PRETA, M. et al. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. **Virchows Archiv**, v. 459, n. 5, p. 477–485, 2011.

CAVELTI-WEDER, C. et al. Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 35, n. 8, p. 1654–1662, 2012.

CAWTHORN, W. P.; SETHI, J. K. TNF-alpha and adipocyte biology. **FEBS letters**, v. 582, n. 1, p. 117–131, 2008.

CERF, M. E. Beta cell dysfunction and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p. 1–12, 2013.

CHANG, G. et al. Exercise Affects Blood Glucose Levels and Tissue Chromium Distribution in High-Fat Diet-Fed C57BL6 Mice. **Molecules**, v. 25, n. 1658, p. 1–12, 2020.

- CHANG, J. S. et al. Circulating irisin levels as a predictive biomarker for sarcopenia: A cross-sectional community-based study. **Geriatrics and Gerontology International**, v. 17, n. 11, p. 2266–2273, 2017.
- CHAWLA, S. et al. The effect of low-fat and low-carbohydrate diets on weight loss and lipid levels: A systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 1–21, 2020.
- CHO, J. et al. Effect of Training Intensity on Hepatic Steatosis and Expression of miRNAs and Target Genes in a High-fat Diet-induced Mice. **Exercise Science**, v. 27, n. 1, p. 32–39, 2018.
- CHOE, S. S. et al. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, p. 1–16, 2016.
- CHUSYD, D. E. et al. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, p. 1–10, 2016.
- CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 11, p. 2347–2355, 2005.
- CLARK, J. E. Diet, exercise or diet with exercise: Comparing the effectiveness of treatment options for weight-loss and changes in fitness for adults (18–65 years old) who are overfat, or obese; systematic review and meta-analysis. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 14, n. 1, p. 1–28, 2015.
- COELHO, D. F. et al. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 10, p. 966–972, 2011.
- COSTA, L. R. et al. High-Intensity Interval Training Does Not Change Vaspin and Omentin and Does Not Reduce Visceral Adipose Tissue in Obese Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. February, p. 1–11, 2021.
- COUSIN, B. et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: Molecular and morphological characterization. **Journal of Cell Science**, v. 103, n. 4, p. 931–942, 1992.
- CRUJEIRAS, A. B. et al. Longitudinal variation of circulating irisin after an energy restriction-induced weight loss and following weight regain in obese men and women. **American Journal of Human Biology**, v. 26, n. 2, p. 198–207, 2014.
- CUI, M. et al. Chronic caloric restriction and exercise improve metabolic conditions of dietary-induced obese mice in autophagy correlated manner without involving ampk. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- DAGDEVIREN, S. et al. Altered Interleukin-10 Signaling in Skeletal Muscle Regulates Obesity-Mediated Inflammation and Insulin Resistance. **Molecular and Cellular Biology**, v. 36, n. 23, p. 2956–2966, 2016.
- DE JESUS, J. M.; KAHAN, S.; ECKEL, R. H. Nutrition Interventions for Cardiovascular Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 6, p. 1251–1264, 2016.
- DE LA IGLESIA, R. et al. Plasma irisin depletion under energy restriction is associated with improvements in lipid profile in metabolic syndrome patients. **Clinical Endocrinology**, v. 81, n. 2, p. 306–311, 2014.
- DE MENECK, F. et al. High irisin levels in overweight/obese children and its positive correlation with metabolic profile, blood pressure, and endothelial progenitor cells. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 28, n. 7, p. 756–764, 2018.
- DE WILDE, J. et al. An 8-Week high-fat diet induces obesity and insulin resistance with small changes in the muscle transcriptome of C57BL/6J mice. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 2, n. 6, p. 280–291, 2010.

- DELA, F.; STALLKNECHT, B. Effect of physical training on insulin secretion and action in skeletal muscle and adipose tissue of first-degree relatives of type 2 diabetic patients. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 299, n. 1, p. 80–91, 2010.
- DEVEAUD, C. et al. Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 267, n. 1–2, p. 157–166, 2004.
- DEWAL, R. S.; STANFORD, K. I. Effects of exercise on brown and beige adipocytes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1864, n. 1, p. 71–78, 2019.
- DI MEO, S.; IOSSA, S.; VENDITTI, P. Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. **Journal of Endocrinology**, v. 234, n. 3, p. R159–R181, 2017.
- DÍAZ-URBINA, D. et al. Effects of a high-fat diet on behavioral eating patterns. **Acta Colombiana de Psicología**, v. 21, n. 1, p. 106–115, 2018.
- DIMITRIADIS, G. et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, n. Suppl 1, p. S52–S59, 2011.
- DO PRADO, W. et al. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378, 2009.
- DONNELLY, J. E. et al. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 2, p. 459–471, 2009.
- DORNELES, G. P. et al. High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals. **Cytokine**, v. 77, p. 1–9, 2016.
- DOS SANTOS, G. C. et al. Acute effects of physical exercise at different intensities on inflammatory markers in obese adolescents. **Journal of Physical Education (Maringá)**, v. 30, n. 1, p. 1–7, 2019.
- DOWAL, L. et al. Intrinsic Properties of Brown and White Adipocytes Have Differential Effects on Macrophage Inflammatory Responses. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, n. 10, p. 1–10, 2017.
- DRENOWATZ, C. et al. The prospective association between different types of exercise and body composition. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 47, n. 12, p. 2535–2541, 2015.
- DREWNOWSKI, A. et al. Sweetness and Food Preference. **The Journal of Nutrition**, n. 7, p. 1142–1148, 2012.
- DUARTE, F. O. et al. Caloric restriction and refeeding promoted different metabolic effects in fat depots and impaired dyslipidemic profile in rats. **Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 177–186, 2008.
- DUSZKA, K. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Caloric Restriction-Common Pathways Affecting Metabolism, Health, and Longevity. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1–73, 2020.
- EBBERT, J. O.; JENSEN, M. D. Fat Depots, Free Fatty Acids, and Dyslipidemia. **Nutrients**, v. 5, n. 2, p. 498–508, 2013.
- EBERT, T. et al. Serum levels of the myokine irisin in relation to metabolic and renal function. **European Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 4, p. 501–506, 2014.
- EKMEN, N. et al. Leptin as an important link between obesity and cardiovascular risk factors in men with acute myocardial infarction. **Indian Heart Journal**, v. 68, n. 2, p. 132–137, 2016.



- ELHADY, M. et al. Fatty pancreas in relation to insulin resistance and metabolic syndrome in children with obesity. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 19–26, 2019.
- ELKIN, L. A. et al. **An Aligned Rank Transform Procedure for Multifactor Contrast Tests**. [s.l.] Association for Computing Machinery, 2021. v. 1
- ESTADELLA, D. et al. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218–224, 2004.
- FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679–689, 2010.
- FAGUNDO, A. B. et al. Modulation of irisin and physical activity on executive functions in obesity and morbid obesity. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–9, 2016.
- FAIENZA, M. F. et al. Mechanisms involved in childhood obesity-related bone fragility. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 1–10, 2019.
- FAIN, J. N. Release of Interleukins and Other Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells. **Vitamins and Hormones**, v. 74, n. 06, p. 443–477, 2006.
- FATOUROS, I. G. Is irisin the new player in exercise-induced adaptations or not? A 2017 update. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 56, n. 4, p. 525–548, 2018.
- FEBBRAIO, M. A. Role of interleukins in obesity: Implications for metabolic disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 312–319, 2014.
- FEDEWA, M. V. et al. The Effect of Chronic Exercise Training on Leptin: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Sports Medicine**, v. 48, n. 6, p. 1437–1450, 2018.
- FERGUSON-STEAGALL, L. et al. Aerobic exercise training adaptations are increased by postexercise carbohydrate-protein supplementation. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2011, p. 1–11, 2011.
- FERLAND, D. J. et al. Chemerin contributes to in vivo adipogenesis in a location-specific manner. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. e0229251, 2020.
- FISCHER, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance. **Exercise immunology review**, v. 1991, n. 12, p. 6–33, 2006.
- FLIER, J. S. et al. Severely impaired adiponectin expression in genetic and acquired obesity. **Science**, v. 237, n. 4813, p. 405–408, 1987.
- FOGELHOLM, M.; STALLKNECHT, B.; VAN BAAK, M. ECSS position statement: Exercise and obesity. **European Journal of Sport Science**, v. 6, n. 1, p. 15–24, 2006.
- FONSECA, D. C. et al. Body weight control and energy expenditure. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 20, p. 55–59, 2018.
- FORDHAL, S. C.; LOCKE, J. L.; JONES, S. R. High Fat Diet Augments Amphetamine Sensitization in Mice: Role of Feeding Pattern, Obesity, and Dopamine Terminal Changes. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 170–182, 2016.
- FORSYTHE, L. K.; WALLACE, J. M. W.; LIVINGSTONE, M. B. E. Obesity and inflammation: The effects of weight loss. **Nutrition Research Reviews**, v. 21, n. 2, p. 117–133, 2008.
- FORTI, N.; DIAMENT, J. High-density lipoproteins: Metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic

intervention aspects. An update for clinicians. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 5, p. 614–622, 2006.

FOSTER, D. O.; FRYDMAN, M. L. Brown adipose tissue: the dominant site of nonshivering thermogenesis in the rat. **Experientia. Supplementum**, v. 32, p. 147–151, 1978.

FRANSSSEN, R. et al. Obesity and Dyslipidemia. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 5, p. 893–902, 2011.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499–502, 1972.

FRÜHBECK, G. et al. FNDC4, a novel adipokine that reduces lipogenesis and promotes fat browning in human visceral adipocytes. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 108, p. 1–15, 2020.

FUKUSHIMA, Y. et al. Relationships between serum irisin levels and metabolic parameters in Japanese patients with obesity. **Obesity Science and Practice**, v. 2, n. 2, p. 203–209, 2016.

GAESSER, G. A. Exercise for prevention and treatment of cardiovascular disease, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. **Current Diabetes Reports**, v. 7, n. 1, p. 14–19, 2007.

GALARRAGA, M. et al. Adiposoft : automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. **Journal of Lipid Research**, v. 53, p. 2791–2796, 2012.

GALEDARI, M.; AZARBAYJANI, M. A.; PEERI, M. Effects of type of exercise along with caloric restriction on plasma apelin 36 and HOMA-IR in overweight men. **Science and Sports**, v. 32, n. 4, p. e137–e145, 2017.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129–139, 2010.

GALLO VALLEJO, J. L.; DÍAZ LÓPEZ, M. A.; CARMONA SALGADO, M. A. Interstitial cystitis as a cause of chronic pelvic pain in gynecology. **Progresos en Obstetricia y Ginecología**, v. 50, n. 3, p. 152–163, 2007.

GAO, D. et al. Interleukin-1 $\beta$  mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 3, p. 289–304, 2014.

GAO, F. et al. FNDC5 polymorphism influences the association between sarcopenia and liver fibrosis in adults with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. **British Journal of Nutrition**, p. 1–12, 2020.

GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

GAO, S. et al. Effects and molecular mechanism of GSTIrisin on lipolysis and autocrine function in 3T3-L1 adipocytes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2016.

GARBER, C. E. et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. **American College of Sports Medicine**, v. 43, n. 7, p. 1334–1359, 2011.

GARBER, C. E. The Health Benefits of Exercise in Overweight and Obese Patients. **Current Sports Medicine Reports**, v. 18, n. 8, p. 287–291, 2019.

- GARCIA, N. F. et al. 7-week aerobic exercise training reduces adipocyte area and improves insulin sensitivity in Wistar rats fed a highly palatable diet. **Motriz. Revista de Educacao Fisica**, v. 22, n. 1, p. 12–17, 2016.
- GASPAR, J. M.; VELLOSO, L. A. Hypoxia inducible factor as a central regulator of metabolism implications for the development of obesity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 1–12, 2018.
- GERHARD, G. S. et al. Gene expression profiling in subcutaneous, visceral and epigastric adipose tissues of patients with extreme obesity. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 3, p. 371–378, 2014.
- GHABEN, A. L.; SCHERER, P. E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 4, p. 242–258, 2019.
- GIORDANO, A.; FRONTINI, A.; CINTI, S. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 6, p. 405–424, 2016.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY. Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, p. 1–25, 2017.
- GOLBIDI, S. et al. Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. **Current Diabetes Reports**, v. 17, n. 12, p. 1–11, 2017.
- GÓMEZ-HERNÁNDEZ, A. et al. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. **International Journal of Endocrinology**, v. 2016, p. 1–15, 2016.
- GOMEZ-SMITH, M. et al. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 167, p. 382–391, 2016.
- GONG, H. et al. The effects of energy intake of four different feeding patterns in rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 1, p. 52–59, 2016.
- GONZÁLEZ, O. A. et al. Caloric Restriction and Chronic Inflammatory Diseases. **Oral Diseases**, v. 18, n. 1, p. 16–31, 2012.
- GORDON, B.; CHEN, S.; DURSTINE, J. L. Exercise is Medicine The Effects of Exercise Training on the Traditional Lipid Profile and Beyond. **Current Sports Medicine Reports**, v. 13, n. 47, p. 159–164, 2016.
- GOYAL, R. et al. Evaluation of TNF- $\alpha$  and IL-6 levels in obese and non-obese diabetics: Pre- and postinsulin effects. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 180–184, 2012.
- GREEN, C. L. et al. The effects of graded levels of calorie restriction: XIV. Global metabolomics screen reveals brown adipose tissue changes in amino acids, catecholamines, and antioxidants after short-term restriction in C57BL/6 mice. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 75, n. 2, p. 218–229, 2020.
- GRIZZI, F.; CHIRIVA-INTERNATI, M. Human binucleate hepatocytes: Are they a defence during chronic liver diseases? **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 2, p. 258–261, 2007.
- GRUBEN, N. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: A main driver of insulin resistance or a dangerous liaison? **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 11, p. 2329–2343, 2014.
- GRUNDY, S. M. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2595–2600, 2004.
- GRUZDEVA, O. et al. Leptin resistance: Underlying mechanisms and diagnosis. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 12, p. 191–198, 2019.
- GRYGIEL-GÓRNIAK, B.; PUSZCZEWICZ, M. A review on irisin, a new protagonist that mediates

muscle-adipose-bone-neuron connectivity. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 20, p. 4687–4693, 2017.

GUILFORD, B. L. et al. Increased FNDC5 is associated with insulin resistance in high fat-fed mice. **Physiological Reports**, v. 15, n. 13, p. 1–10, 2017.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367–377, 2008.

GURLEY, J. M.; GRIESEL, B. A.; OLSON, A. L. Increased Skeletal Muscle GLUT4 Expression in Obese Mice After Voluntary Wheel Running Exercise Is Posttranscriptional. **Diabetes**, v. 65, n. 10, p. 2911–2919, 2016.

GUTIERREZ-REPISO, C. et al. FNDC5 could be regulated by leptin in adipose tissue. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 44, n. 10, p. 918–925, 2014.

HALL, K. D. et al. Calorie for calorie, dietary fat restriction results in more body fat loss than carbohydrate restriction in people with obesity. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 3, p. 427–436, 2015.

HALL, K. D.; GUO, J. Obesity Energetics: Body Weight Regulation and the Effects of Diet Composition. **Gastroenterology**, v. 152, n. 7, p. 1718–1727, 2017.

HAMMAN, R. F. et al. Effect of weight loss with lifestyle intervention on risk of diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 9, p. 2102–2107, 2006.

HANSSON, B. et al. Adipose cell size changes are associated with a drastic actin remodeling. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 270–299, 2010.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252–1263, 2013.

HECKSTEDEN, A. et al. Irisin and exercise training in humans - Results from a randomized controlled training trial. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

HEISKANEN, M. A. et al. Exercise training decreases pancreatic fat content and improves beta cell function regardless of baseline glucose tolerance: a randomised controlled trial. **Diabetologia**, v. 61, n. 8, p. 1817–1828, 2018.

HENRY, B. A. et al. Central leptin activates mitochondrial function and increases heat production in skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 152, n. 7, p. 2609–18, 2011.

HERMSDORFF, H. H.; MONTEIRO, J. B. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 48, p. 803–811, 2004.

HERZ, C. T.; KIEFER, F. W. Adipose tissue browning in mice and humans. **Journal of Endocrinology**, v. 241, n. 3, p. R97–R109, 2019.

HEW-BUTLER, T. et al. Plasma irisin in runners and nonrunners: No favorable metabolic associations in humans. **Physiological Reports**, v. 3, n. 1, p. 1–12, 2015.

HIGA, T. S. et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47–54, 2014.

- HO-PHAM, L. T.; CAMPBELL, L. V.; NGUYEN, T. V. More on body fat cutoff points. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 6, p. 584–587, 2011.
- HOEVENAARS, F. P. M. et al. Adipose tissue metabolism and inflammation are differently affected by weight loss in obese mice due to either a high-fat diet restriction or change to a low-fat diet. **Genes and Nutrition**, v. 9, n. 3, p. 1–11, 2014.
- HORNG, T.; HOTAMISLIGIL, G. S. Linking the inflammasome to obesity-related disease. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 164–165, 2011.
- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 11, p. 4854–4858, 1994a.
- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity- diabetes. Central role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 4, p. 1543–9, 1994b.
- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2409–15, 1995.
- HOTAMISLIGIL, G. S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665–668, 1996.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87–91, 1993.
- HOUMARD, J. A. et al. Effect of short-term exercise training on leptin and insulin action. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 7, p. 858–861, 2000.
- HUFFMAN, D. M. Exercise as a calorie restriction mimetic: Implications for improving healthy aging and longevity. **Interdisciplinary Topics in Gerontology**, v. 37, p. 157–174, 2010.
- HUH, J. Y. et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. **Metabolism**, v. 61, n. 12, p. 1725–1738, 2012.
- IOM - Institute of Medicine. State of the Science and Opportunities for Military Programs. In: (US), N. A. P. (Ed.). **Weight Management**: Washington, D.C.: National Academies Press, 2004.
- ISMAIL, I. et al. A systematic review and meta-analysis of the effect of aerobic vs. resistance exercise training on visceral fat. **Obesity Reviews**, v. 13, n. 1, p. 68–91, 2012.
- JASTREBOFF, A. M. et al. Obesity as a Disease: The Obesity Society 2018 Position Statement. **Obesity**, v. 27, n. 1, p. 7–9, 2019.
- JEANSON, Y.; CARRIÈRE, A.; CASTEILLA, L. A new role for browning as a redox and stress adaptive mechanism? **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 1–11, 2015.
- JEDRYCHOWSKI, M. P. et al. Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. **Cell metabolism**, v. 22, n. 4, p. 734–740, 2015.
- JENSEN, B. et al. Limitations of fat-free mass for the assessment of muscle mass in obesity. **Obesity Facts**, v. 12, n. 3, p. 307–315, 2019.
- JENSEN, M. D. et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines and the obesity society. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 25 Suppl 2,

p. 2985–3023, 2014.

JEON, S. M. et al. Vitamin E supplementation alters HDL-cholesterol concentration and paraoxonase activity in rabbits fed high-cholesterol diet: Comparison with probucol. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 19, n. 5, p. 336–346, 2005.

JIANG, N. et al. Cytokines and inflammation in adipogenesis: an updated review. **Frontiers of Medicine**, v. 13, n. 3, p. 314–329, 2019.

JO, J. et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 3, p. 11, 2009.

JO, J.; SHREIF, Z.; PERIWAL, V. Quantitative dynamics of adipose cells. **Adipocyte**, v. 1, n. 2, p. 80–88, 2012.

JUGE-AUBRY, C. E. et al. Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10. **Cytokine**, v. 29, n. 6, p. 270–274, 2005.

KAHN, C. R.; WANG, G.; LEE, K. Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 10, p. 3990–4000, 2019.

KANDA, T. et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 24, n. 25, p. 2661–2672, 2018.

KANG, Y. S. et al. Effects of swimming exercise on serum irisin and bone FNDC5 in rat models of high-fat diet-induced osteoporosis. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 18, n. 4, p. 596–603, 2019.

KARPE, F.; DICKMANN, J. R.; FRAYN, K. N. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: Time for a reevaluation. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2441–2449, 2011.

KATSUKI, A. et al. Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 3, p. 859–862, 1998.

KAWANISHI, N. et al. Exercise training attenuates neutrophil infiltration and elastase expression in adipose tissue of high-fat-diet-induced obese mice. **Physiological Reports**, v. 3, n. 9, p. 3–10, 2015.

KAZEMINASAB, F. et al. A comparative study on the effects of high-fat diet and endurance training on the PGC-1 $\alpha$ -FNDC5/irisin pathway in obese and nonobese male C57BL/6 mice. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 43, n. 7, p. 651–662, 2018.

KEATING, S. E. et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 1, p. 174–182, 2015.

KIM, H. et al. Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via  $\alpha$ V integrin receptors. **Cell**, v. 175, n. e1717, p. 1756–1768, 2018.

KIM, H. J. et al. Effect of aerobic training and resistance training on circulating irisin level and their association with change of body composition in overweight/obese adults: A pilot study. **Physiological Research**, v. 65, n. 2, p. 271–279, 2016.

KIRAT, D. et al. Irisin/FNDC5: A participant in camel metabolism. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 693–706, 2021.

KLOP, B.; ELTE, J. W. F.; CABEZAS, M. C. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1218–1240, 2013.

- KO, K. et al. Exercise training improves intramuscular triglyceride lipolysis sensitivity in high-fat diet induced obese mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 81, p. 1–7, 2018.
- KOENEN, T. B. et al. The inflammasome and caspase-1 activation: A new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. **Endocrinology**, v. 152, n. 10, p. 3769–78, 2011.
- KOLAHDOUZI, S. et al. Exercise training prevents high-fat diet-induced adipose tissue remodeling by promoting capillary density and macrophage polarization. **Life Sciences**, v. 220, p. 32–43, 2019.
- KONDO, H. et al. Interleukin 10 Treatment Ameliorates High-Fat Diet-Induced Inflammatory Atrial Remodeling and Fibrillation. **Circulation. Arrhythmia and electrophysiology**, v. 11, n. 5, p. e006040, 2018.
- KORTA, P.; POCHE, E.; MAZUR-BIAŁY, A. Irisin Multifunctional protein. **Medicina**, v. 55, p. 1–14, 2019.
- KRAUNSSØE, R. et al. Mitochondrial respiration in subcutaneous and visceral adipose tissue from patients with morbid obesity. **Journal of Physiology**, v. 588, n. 12, p. 2023–2032, 2010.
- KRISTENSEN, M. M. et al. miRNAs in human subcutaneous adipose tissue: Effects of weight loss induced by hypocaloric diet and exercise. **Obesity**, v. 25, n. 3, p. 572–580, 2017.
- KUK, J. L.; JANISZEWSKI, P. M.; ROSS, R. Exercise, visceral adipose tissue, and metabolic risk. **Current Cardiovascular Risk Reports**, v. 1, n. 3, p. 254–264, 2007.
- KUNSTETTER, A. C. et al. Pre-exercise exposure to the treadmill setup changes the cardiovascular and thermoregulatory responses induced by subsequent treadmill running in rats. **Temperature**, v. 5, n. 2, p. 109–122, 2018.
- KURAUTI, M. A. et al. Acute exercise restores insulin clearance in diet-induced obese mice. **Journal of Endocrinology**, v. 229, n. 3, p. 221–232, 2016.
- KURDIOVA, T. et al. Exercise-mimicking treatment fails to increase Fndc5 mRNA & irisin secretion in primary human myotubes. **Peptides**, v. 56, p. 1–7, 2014.
- KURYŁOWICZ, A.; PUZIANOWSKA-KUŹNICKA, M. Induction of adipose tissue browning as a strategy to combat obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–28, 2020.
- KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 9, p. 639–660, 2016.
- LA FUENTE, F. P. DE et al. Exercise regulates lipid droplet dynamics in normal and fatty liver. **Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1864, n. 12, p. 1–10, 2019.
- LACERDA, D. DOS S. et al. Biochemical and Physiological Parameters in Rats Fed with High-Fat Diet: The Protective Effect of Chronic Treatment with Purple Grape Juice (Bordo Variety). **Beverages**, v. 4, n. 4, p. 1–13, 2018.
- LAI, M.; CHANDRASEKERA, P. C.; BARNARD, N. D. You are what you eat, or are you? the challenges of translating high-fat-fed rodents to human obesity and diabetes. **Nutrition and Diabetes**, v. 4, n. 9, p. e135-10, 2014.
- LANDGRAF, K. et al. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1249–1261, 2015.
- LANG, P. et al. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

LARSEN, C. M. et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 15, p. 1517–26, 2007.

LARSON-MEYER, D. E. et al. Effect of 6-Month Calorie Restriction and Exercise on Serum and Liver Lipids and Markers of Liver Function. **Obesity**, v. 16, n. 6, p. 1355–1362, 2008.

LAURSEN, T. L. et al. Leptin, adiponectin, and ghrelin responses to endurance exercise in different ambient conditions. **Temperature**, v. 4, n. 2, p. 166–175, 2017.

LEE, C.; LONGO, V. Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 1–7, 2016.

LEE, H. J. et al. Irisin, a novel myokine, regulates glucose uptake in skeletal muscle cells via AMPK. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 6, p. 873–881, 2015a.

LEE, I. et al. (-)-Epicatechin combined with 8 weeks of treadmill exercise is associated with increased angiogenic and mitochondrial signaling in mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1–10, 2015b.

LEE, J. H. et al. The role of adipose tissue mitochondria: Regulation of mitochondrial function for the treatment of metabolic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 1–22, 2019.

LEE, P. et al. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 302–309, 2014.

LEFEVRE, M. et al. Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy and non-obese individuals. **Atherosclerosis**, v. 203, n. 1, p. 206–213, 2009.

LEHNIG, A. C. et al. Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. **iScience**, v. 11, p. 425–439, 2019.

LEIGH, S. J.; KENDIG, M. D.; MORRIS, M. J. Palatable western-style cafeteria diet as a reliable method for modeling diet-induced obesity in rodents. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 153, p. 1–10, 2019.

LEON-CABRERA, S. et al. Reduced Systemic levels of IL-10 are associated with the severity of obstructive sleep apnea and insulin resistance in morbidly obese humans. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

LIANG, H.; WARD, W. F. PGC-1 $\alpha$ : A key regulator of energy metabolism. **American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education**, v. 30, n. 4, p. 145–151, 2006.

LICHOLAI, J. A. et al. Why do mice over-eat high fat diets? How high fat diet alters the regulation of daily caloric intake in mice. **Obesity**, v. 26, n. 6, p. 1026–1033, 2018.

LINO, A. D. DE S. et al. Resistance training decreases lipid content of different fat deposits in ovariectomized rats. **Asian Journal of Sports Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2018.

LIU, S. et al. Effects and underlying mechanisms of irisin on the proliferation and apoptosis of pancreatic  $\beta$  cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–12, 2017.

LIU, T. Y. et al. FNDC5 alleviates hepatosteatosis by restoring ampk/mtor-mediated autophagy, fatty acid oxidation, and lipogenesis in mice. **Diabetes**, v. 65, n. 11, p. 3262–3275, 2016.

LÖFFLER, D. et al. Serum irisin levels are regulated by acute strenuous exercise. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 4, p. 1289–1299, 2015.

LOMBARDO, M. et al. Ideal Reduction of Calories for Greatest Reduction of Body Fat and Maintenance



- of Lean Body Mass. **Journal of Aging Research & Clinical Practice**, v. 9, n. 4, p. 1–7, 2017.
- LONČAR, D. Convertible adipose tissue in mice. **Cell and Tissue Research**, v. 266, n. 1, p. 149–161, 1991.
- LONGO, M. et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 1–23, 2019.
- LOPEZ-LEGARREA, P. et al. Higher baseline irisin concentrations are associated with greater reductions in glycemia and insulinemia after weight loss in obese subjects. **Nutrition and Diabetes**, v. 4, n. 2, p. e110–4, 2014.
- LOWELL, B. B. et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. **Nature**, v. 366, n. 6457, p. 740–742, 1993.
- LOYD, C.; OBICI, S. Brown fat fuel use and regulation of energy homeostasis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, n. 4, p. 368–372, 2014.
- LU, M. et al. Effects of low-fat compared with high-fat diet on cardiometabolic indicators in people with overweight and obesity without overt metabolic disturbance: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **British Journal of Nutrition**, v. 119, n. 1, p. 96–108, 2018.
- LU, Y. et al. Swimming exercise increases serum irisin level and reduces body fat mass in high-fat-diet fed Wistar rats. **Lipids in health and disease**, v. 15, p. 1–8, 2016.
- LUGLIO, H. F. et al. Leptin, appetite and weight rebound in overweight/obesity individuals undertook weight loss program using a low calorie diet with or without exercise. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 223–233, 2017.
- LUMENG, C. N.; SALTIEL, A. R. Review series Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **Life Sciences**, v. 121, n. 6, p. 2111–2117, 2011.
- LUO, L.; LIU, M. Adipose tissue in control of metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 231, n. 3, p. R77–R99, 2016.
- LUONG, Q.; LEE, K. Y. **The Heterogeneity of White Adipose Tissue**. Intech Open, 2018, p.178-206.
- MA, H. et al. Effects of a low-fat diet on the hepatic expression of adiponectin and its receptors in rats with NAFLD. **Annals of Hepatology**, v. 14, n. 1, p. 108–117, 2015.
- MACEDO, S. M. DE et al. Effects of Dietary Macronutrient Composition on FNDC5 and Irisin in Mice Skeletal Muscle. **Metabolics Syndrome and Related Disorders**, v. XX, n. Xx, p. 1–9, 2017.
- MAEDLER, K. et al. Glucose-induced  $\beta$  cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 6, p. 851–860, 2002.
- MAFFEIS, C. et al. Meal-induced thermogenesis and obesity: Is a fat meal a risk factor for fat gain in children? **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 1, p. 214–219, 2001.
- MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Pharmacological treatment of obesity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 377–389, 2006.
- MANNE, V.; SAAB, S. Impact of nutrition and obesity on chronic liver disease. **Clinics in Liver Disease**, v. 18, n. 1, p. 205–218, 2014.
- MATSUZAKA, T.; SHIMANO, H. Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 2, n. 3, p. 170–175, 2011.

- 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.
- MCARDLE, M. A. et al. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p. 1–23, 2013.
- MERLOTTI, C. et al. Subcutaneous fat loss is greater than visceral fat loss with diet and exercise, weight-loss promoting drugs and bariatric surgery: A critical review and meta-analysis. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 5, p. 672–682, 2017.
- MESSA, G. A. M. et al. The impact of a high-fat diet in mice is dependent on duration and age, and differs between muscles. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 6, p. 1–15, 2020.
- MEYDANI, S. N. et al. Long-term moderate calorie restriction inhibits inflammation without impairing cell-mediated immunity: A randomized controlled trial in non-obese humans. **Aging**, v. 8, n. 7, p. 1416–1431, 2016.
- MILLER, K. N. et al. Aging and caloric restriction impact adipose tissue, adiponectin, and circulating lipids. **Aging Cell**, v. 16, n. 3, p. 497–507, 2017.
- MINOKOSHI, Y. et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature**, v. 415, n. 6869, p. 339–43, 2002.
- MIZGIER, M. L. et al. Potential role of skeletal muscle glucose metabolism on the regulation of insulin secretion. **Obesity Reviews**, v. 15, n. 7, p. 587–597, 2014.
- MOLDOVEANU, A. I.; SHEPHARD, R. J.; SHEK, P. N. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in blood mononuclear cells. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 4, p. 1499–1504, 2000.
- MORENO-NAVARRETE, J. M. et al. Irisin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 4, p. 1–10, 2013.
- MORO, C.; BAJPEYI, S.; SMITH, S. R. Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 294, p. E203-213, 2008.
- MORTON, T. L. et al. Exercise Increases and Browns Muscle Lipid in High-Fat Diet-Fed Mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, p. 1–8, 2016.
- MUIR, L. A. et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 597–605, 2016.
- MUIR, L. A. et al. Adipocyte hypertrophy-hyperplasia balance contributes to weight loss after bariatric surgery. **Adipocyte**, v. 6, n. 2, p. 134–140, 2017.
- MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.
- MUSCELLA, A. et al. The regulation of fat metabolism during aerobic exercise. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1–29, 2020.
- MYERS, M. G. et al. Obesity and leptin resistance: Distinguishing cause from effect. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 11, p. 643–651, 2010.
- NEELAND, I. J. et al. Visceral and ectopic fat, atherosclerosis, and cardiometabolic disease: a position

statement. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 715–725, 2019.

NEVES, R. H. et al. Hepatic stereology of schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. Suppl 1, p. 253–260, 2006.

NICKLAS, B. J. et al. Effect of exercise intensity on abdominal fat loss during calorie restriction in overweight and obese postmenopausal women: A randomized, controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 4, p. 1043–1052, 2009.

NIE, Y.; LIU, D. N-Glycosylation is required for FDNC5 stabilization and irisin secretion. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 18, p. 3167–3177, 2017.

NIEDERREITER, L.; TILG, H. Cytokines and fatty liver diseases. **Liver Research**, v. 2, n. 1, p. 14–20, 2018.

NIELSEN, H. G. et al. Plasma Cytokine Profiles in Long-Term Strenuous Exercise. **Journal of Sports Medicine**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

NORDESTGAARD, B. G.; WOOTTON, R.; LEWIS, B. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo: Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima-inner media. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 15, n. 4, p. 534–542, 1995.

NOVAES, R. D. et al. Trypanosoma cruzi infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 4, p. 270–279, 2013.

OISHI, J. C. et al. Endothelial dysfunction and inflammation precedes elevations in blood pressure induced by a high-fat diet. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 6, p. 558–567, 2018.

OK, D. P.; KO, K.; BAE, J. Y. Exercise without dietary changes alleviates nonalcoholic fatty liver disease without weight loss benefits. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2018.

OTT, B. et al. Effect of caloric restriction on gut permeability, inflammation markers, and fecal microbiota in obese women. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

PALEY, C. A.; JOHNSON, M. I. Abdominal obesity and metabolic syndrome: Exercise as medicine? **BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2018.

PALMER, N. O. et al. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 7, p. 768–780, 2012.

PALOMERA, LE. F. et al. Serum levels of interleukin-1 beta associate better with severity of simple steatosis than liver function tests in morbidly obese patients. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 23, n. 93, p. 1–4, 2018.

PARDO, M. et al. Association of irisin with fat mass, resting energy expenditure, and daily activity in conditions of extreme body mass index. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

PARENTE, E. B. Is body mass index still a good tool for obesity evaluation? **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 6, p. 507–509, 2016.

PARK, K. H. et al. Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 12, p. 4899–4907, 2013.

PARK, M. J. et al. New role of irisin in hepatocytes: The protective effect of hepatic steatosis in vitro.

**Cellular Signalling**, v. 27, n. 9, p. 1831–1839, 2015.

PARK, S. Y. et al. Calorie restriction improves whole-body glucose disposal and insulin resistance in association with the increased adipocyte-specific GLUT4 expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 436, n. 2, p. 276–284, 2005.

PARK, Y. et al. Vitamin C Inhibits Visceral Adipocyte Hypertrophy and Lowers Blood Glucose Levels in High-Fat-Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice. **Biomedical Science Letters**, v. 24, n. 4, p. 311–318, 2018.

PARLEE, S. D. et al. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. **Methods in Enzymology**, v. 537, p. 93–122, 2014.

PAULI, J. R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 4, p. 399–408, 2009.

PAZ-FILHO, G.; MASTRONARDI, C. A.; LICINIO, J. Leptin treatment: Facts and expectations. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 1, p. 146–156, 2015.

PEAKE, J. M. et al. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: Regulatory mechanisms and exercise effects. **Exercise Immunology Review**, v. 21, n. 32, p. 8–25, 2015.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1379–1406, 2008.

PERAKAKIS, N. et al. Physiology and role of irisin in glucose homeostasis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 324–337, 2017.

PÉREZ-SOTELO, D. et al. Lack of Adipocyte-Fndc5/Irisin Expression and Secretion Reduces Thermogenesis and Enhances Adipogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017.

PESENTHEINER, A. R.; DUCASA, G. M.; GORDTS, P. L. S. M. Proteoglycans in Obesity-Associated Metabolic Dysfunction and Meta-Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–18, 2020.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. Suppl 10, p. 43–51, 2006.

PETERSON, J. M.; MART, R.; BOND, C. E. Effect of obesity and exercise on the expression of the novel myokines, Myonectin and Fibronectin type III domain containing 5. **PeerJ**, v. 2, p. e605, 2014.

PETRIDOU, A.; SIOPI, A.; MOUGIOS, V. Exercise in the management of obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 92, p. 163–169, 2019.

PETROVIC, N. et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7153–7164, 2010.

PIERARD, M. et al. Interactions of exercise training and high-fat diet on adiponectin forms and muscle receptors in mice. **Nutrition and Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016.

PORET, JO. M. et al. High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 3, p. 535–541, 2018.

PRADO, C. M. M.; HEYMSFIELD, S. B. Lean tissue imaging: A new era for nutritional assessment and intervention. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 940–953, 2014.

- PUIGSERVER, P. et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 829–839, 1998.
- QUIÑONES, M. et al. Circulating Irisin Levels Are Not Regulated by Nutritional Status, Obesity, or Leptin Levels in Rodents. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- QURESHI, K.; ABRAMS, G. A. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 26, p. 3540–3553, 2007.
- RACHETTI, A. L. F. et al. Fish oil supplementation and physical exercise program: Distinct effects on different memory tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 237, n. 1, p. 283–289, 2013.
- RAHIER, J. et al. Pancreatic  $\beta$ -cell mass in European subjects with type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 10, n. Suppl 4, p. 32–42, 2008.
- RASHID, F. A. et al. Effect of Long-Term Moderate Physical Exercise on Irisin between Normal Weight and Obese Men. **Scientific World Journal**, v. 2020, p. 1–7, 2020.
- RASHID, S.; GENEST, J. Effect of obesity on high-density lipoprotein metabolism. **Obesity**, v. 15, n. 12, p. 2875–2888, 2007.
- REZNICK, R. M. et al. Aging-Associated Reductions in AMP-Activated Protein Kinase Activity and Mitochondrial Biogenesis. **Cell Metabolism**, v. 5, n. 2, p. 151–156, 2007.
- RIUS-PÉREZ, S. et al. PGC-1  $\alpha$ , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–20, 2020.
- ROCA-RIVADA, A. et al. FNDC5/Irisin Is Not Only a Myokine but Also an Adipokine. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.
- ROCHA-RODRIGUES, S. et al. Impact of physical exercise on visceral adipose tissue fatty acid profile and inflammation in response to a high-fat diet regimen. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 87, p. 114–124, 2017.
- ROCHA-RODRIGUES, S. et al. Physical exercise mitigates high-fat diet-induced adiposopathy and related endocrine alterations in an animal model of obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 74, n. 2, p. 235–246, 2018a.
- ROCHA-RODRIGUES, S. et al. Effects of endurance training on autophagy and apoptotic signaling in visceral adipose tissue of prolonged high fat diet-fed rats. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 2237–2247, 2018b.
- RODRIGUES, A. C. et al. Aerobic exercise and lipolysis: A review of the  $\beta$ -adrenergic signaling pathways in adipose tissue. **Science and Sports**, v. 36, n. 1, p. 16–26, 2021.
- RODRIGUES, M. et al. Caloric restriction-induced weight loss with a high-fat diet does not fully recover visceral adipose tissue inflammation in previously obese C57BL/6 mice. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 45, n. 12, p. 1353–1359, 2020.
- RODRÍGUEZ, A. et al. Leptin administration activates irisin-induced myogenesis via nitric oxide-dependent mechanisms, but reduces its effect on subcutaneous fat browning in mice. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 3, p. 397–407, 2015.
- ROGERS, M. A. et al. Improvement in glucose tolerance after 1 wk of exercise in patients with mild NIDDM. **Diabetes Care**, v. 11, n. 8, p. 613–618, 1988.

- RÖHLING, M. et al. Influence of Acute and Chronic Exercise on Glucose Uptake. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1–33, 2016.
- ROLLAND, C.; BROOM, I. The effects of very-low-calorie diets on HDL: A review. **Cholesterol**, v. 2011, p. 1–10, 2011.
- ROMIEU, I. et al. Energy balance and obesity: what are the main drivers? **Cancer Causes and Control**, v. 28, n. 3, p. 247–258, 2017.
- ROSEN, E. D. et al. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : A unified pathway. **Genes and Development**, v. 16, n. 1, p. 22–26, 2002.
- ROSS, R.; SONI, S.; HOULE, S. A. Negative energy balance induced by exercise or diet: Effects on visceral adipose tissue and liver fat. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1–13, 2020.
- ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Nature**, v. 281, n. 5726, p. 31–35, 1979.
- ROZA, N. A. V et al. Effect of long-term high-fat diet intake on peripheral insulin sensibility, blood pressure, and renal function in female rats. **Food & Nutrition**, v. 60, p. 1–10, 2016.
- RUTKOWSKI, J. M.; STERN, J. H.; SCHERER, P. E. The cell biology of fat expansion. **Journal of Cell Biology**, v. 208, n. 5, p. 501–512, 2015.
- RYDÉN, M. et al. Adipose tissue and metabolic alterations: Regional differences in fat cell size and number matter, but differently: A cross-sectional study. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 10, p. E1870–E1876, 2014.
- SABAG, A. et al. Exercise and ectopic fat in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes and Metabolism**, v. 43, n. 3, p. 195–210, 2017.
- SAFARI, Z. et al. Steatosis and gut microbiota dysbiosis induced by high-fat diet are reversed by 1-week chow diet administration. **Nutrition Research**, v. 71, p. 72–88, 2019.
- SAITO, M. et al. Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 1–13, 2020.
- SAKAI, N. S.; TAYLOR, S. A.; CHOUHAN, M. D. Obesity, metabolic disease and the pancreas-Quantitative imaging of pancreatic fat. **British Journal of Radiology**, v. 91, n. 1089, p. 1–9, 2018.
- SALAMAT, K. M. et al. The response of pre-inflammatory cytokines factors to different exercises (endurance, resistance, concurrent) in overweight men. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 52, n. 4, p. 367–370, 2016.
- SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 1–4, 2017.
- SAMY, D. M.; ISMAIL, C. A.; NASSRA, R. A. Circulating irisin concentrations in rat models of thyroid dysfunction - Effect of exercise. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 7, p. 804–813, 2015.
- SANCHIS-GOMAR, F.; PEREZ-QUILIS, C. Irisinemia: A novel concept to coin in clinical medicine? **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 63, n. 1–2, p. 60–61, 2013.
- SANTOS, E. W. et al. Short-term high-fat diet affects macrophages inflammatory response, early signs of a long-term problem. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 55, p. 1–12, 2019.
- SAVIG, M. S. **Exercise Cardiopulmonary function in cardiac patients**. 1. ed. [s.l.] Springer, London,

2012.

SAVVIDIS, C.; TOURNIS, S.; DEDE, A. D. Obesity and bone metabolism American Association of Clinical Endocrinologists. **Hormones**, v. 17, n. 2, p. 205–217, 2018.

SCHAALAN, M. F.; RAMADAN, B. K.; ABD ELWAHAB, A. H. Synergistic effect of carnosine on browning of adipose tissue in exercised obese rats; a focus on circulating irisin levels. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 6, p. 5044–5057, 2018.

SCHOETTL, T.; FISCHER, I. P.; USSAR, S. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. (Pt Suppl 1), p. 17, 2018.

SCHULTZ, A. et al. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 21873–21886, 2013.

SCHUMACHER, M. A. et al. The structure of Irisin reveals a novel intersubunit  $\beta$ -sheet fibronectin type III (FNIII) dimer: Implications for receptor activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 47, p. 33738–33744, 2013.

SENE-FIORESE, M. et al. Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. **Obesity**, v. 16, n. 10, p. 2217–2222, 2008.

SEO, D. Y. et al. Effects of aged garlic extract and endurance exercise on skeletal muscle FNDC-5 and circulating irisin in high-fat-diet rat models. **Nutrition Research and Practice**, v. 8, n. 2, p. 177–182, 2014.

SERRANO, A. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of regular consumption of cooked ham enriched with dietary phenolics in diet-induced obese mice. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 1–18, 2020.

SHANG, Y. et al. Short Term High Fat Diet Induces Obesity-Enhancing Changes in Mouse Gut Microbiota That are Partially Reversed by Cessation of the High Fat Diet. **Lipids**, v. 52, n. 6, p. 499–511, 2017.

SHIRKHANI, S. et al. Comparative studies on the effects of high-fat diet, endurance training and obesity on Ucp1 expression in male C57BL/6 mice. **Gene**, v. 676, p. 16–21, 2018.

SHIRVANI, H.; DELPASAND, A.; BAZGIR, B. The data on the aerobic training with or without calorie restriction and muscular levels of Irisin and muscular FNDC5 concentration in obese male Wistar rats. **Data in Brief**, v. 21, p. 888–892, 2018.

SHODA, H. et al. Increased serum concentrations of IL-1 beta, IL-21 and Th17 cells in overweight patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2017.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169–2180, 2007.

SLOAN-LANCASTER, J. et al. Double-blind, randomized study evaluating the glycemic and antiinflammatory effects of subcutaneous LY2189102, a neutralizing IL-1beta; Antibody, in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 36, n. 8, p. 2239–2246, 2013.

SMITH, N. J. G. et al. A comparison of dietary and caloric restriction models on body composition, physical performance, and metabolic health in young mice. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 2019.

SMITH, R. L. et al. Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 4, p. 489–517, 2018.

SMITS, M. M.; VAN GEENEN, E. J. M. The clinical significance of pancreatic steatosis. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 3, p. 169–177, 2011.

- SONG, N. J. et al. Induction of thermogenic adipocytes: molecular targets and thermogenic small molecules. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 49, n. 7, p. e353, 2017.
- SOUZA, R. W. A. et al. Differential regulation of cysteine oxidative post-translational modifications in high and low aerobic capacity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.
- SPEAKER, K. J.; FLESHNER, M. Interleukin-1 beta: A potential link between stress and the development of visceral obesity. **BMC Physiology**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2012.
- SPEAKMAN, J. R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. **International Journal of Obesity**, v. 43, n. 8, p. 1491–1492, 2019.
- SPERETTA, G. F. F. et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics**, v. 67, n. 12, p. 1469–1477, 2012.
- SPERETTA, G. F. et al. High-fat diet increases respiratory frequency and abdominal expiratory motor activity during hypercapnia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 258, p. 32–39, 2018.
- STANSBIE, D. et al. Effects of anti-insulin serum and glucagon on (a) in vivo rates of fatty acid synthesis and (b) activities of pyruvate dehydrogenase and acetyl-Coenzyme A carboxylase in rat adipose tissue and liver. **Diabetologia**, v. 13, n. 4, p. 413–416, 1977.
- STENGEL, A. et al. Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity-Correlation with body mass index. **Peptides**, v. 39, n. 1, p. 125–130, 2013.
- STENHOLM, S. et al. Sarcopenic obesity: Definition, cause and consequences. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 11, n. 6, p. 693–700, 2008.
- STEPHENS, J. M.; LEE, J.; PILCH, P. F. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 971–976, 1997.
- STOLARCZYK, E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 37, p. 35–40, 2017.
- STRISSEL, K. J. et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. **Diabetes**, v. 56, n. 12, p. 2910–2918, 2007.
- 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, 2014.
- SULEIMAN, J. B.; MOHAMED, M.; BAKAR, A. B. A. A systematic review on different models of inducing obesity in animals: Advantages and limitations. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 7, n. 1, p. 103–114, 2020.
- SWIFT, D. L. et al. The Effects of Exercise and Physical Activity on Weight Loss and Maintenance. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 61, n. 2, p. 206–213, 2018.
- TALLIS, J.; JAMES, R. S.; SEEBACHER, F. The effects of obesity on skeletal muscle contractile function. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 13, p. 14, 2018.
- TAM, C. S. et al. IL-6, IL-8 and IL-10 levels in healthy weight and overweight children. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 73, n. 2, p. 128–134, 2010.



- TANG, L. et al. The association of circulating irisin with metabolic risk factors in Chinese adults: A cross-sectional community-based study. **BMC Endocrine Disorders**, v. 19, n. 1, p. 1–6, 2019.
- THEODOROU, A. A. et al. Aerobic , resistance and combined training and detraining on body composition, muscle strength , lipid profile and inflammation in coronary artery disease patients. **Research in Sports Medicine**, v. 24, n. 3, p. 171–184, 2016.
- TOMITA, T. Apoptosis in pancreatic  $\beta$ -islet cells in Type 2 diabetes. **Bosnian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 3, p. 162–179, 2016.
- TOTH, P. P. et al. High-density lipoproteins: A consensus statement from the National Lipid Association. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 7, n. 5, p. 484–525, 2013.
- TROUWBORST, I. et al. Exercise and nutrition strategies to counteract sarcopenic obesity. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 1–21, 2018.
- TSAI, M. et al. Stimulation of leptin secretion by insulin. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. Suppl 3, p. S543–S548, 2012.
- TUMOVA, J.; ANDEL, M.; TRNKA, J. Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle. **Physiological Research**, v. 65, n. 2, p. 193–207, 2016.
- TZANAVARI, T.; GIANNOGONAS, P.; KARALIS, K. P. TNF- $\alpha$  and obesity. **Current Directions in Autoimmunity**, v. 11, p. 145–156, 2010.
- UETA, C. B. et al.  $\beta$ 1 Adrenergic receptor is key to cold-and diet-induced thermogenesis in mice. **Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 3, p. 359–365, 2012.
- UNAL, M. et al. Investigation of serum leptin levels and VO<sub>2</sub>max value in trained young male athletes and healthy males. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 92, n. 2, p. 173–179, 2005.
- UNAMUNO, X.; FRÜHBECK, G.; CATALÁN, V. Adipose tissue. In: **Encyclopedia of Endocrine Diseases**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 370–384.
- URANGA, R. M.; KELLER, J. N. The complex interactions between obesity, metabolism and the brain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 1–21, 2019.
- VAN BEEK, L. et al. The limited storage capacity of gonadal adipose tissue directs the development of metabolic disorders in male C57Bl/6J mice. **Diabetologia**, v. 58, n. 7, p. 1601–1609, 2015.
- VAN GEMERT, W. A. et al. Effect of diet with or without exercise on abdominal fat in postmenopausal women - A randomised trial. **BMC Public Health**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2019.
- VANGOITSENHOVEN, R. et al. At similar weight loss, dietary composition determines the degree of glycemic improvement in diet-induced obese C57BL/6 mice. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–16, 2018.
- VARELA-RODRÍGUEZ, B. M. et al. FNDC5 expression and circulating irisin levels are modified by diet and hormonal conditions in hypothalamus, adipose tissue and muscle. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016.
- VAUGHAN, R. A. et al. Characterization of the metabolic effects of irisin on skeletal muscle in vitro. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 16, n. 01, p. 711–718, 2014.
- VEILLEUX, A. et al. Visceral adipocyte hypertrophy is associated with dyslipidemia independent of body composition and fat distribution in women. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1504–1511, 2011.
- VERBOVEN, K. et al. Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation

- relate to insulin resistance in male obese humans. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.
- VERHEGGEN, R. J. H. M. et al. A systematic review and meta-analysis on the effects of exercise training versus hypocaloric diet: distinct effects on body weight and visceral adipose tissue. **Obesity Reviews**, v. 17, n. 8, p. 664–690, 2016.
- VIDAL, P.; STANFORD, K. I. Exercise-Induced Adaptations to Adipose Tissue Thermogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 1–12, 2020.
- VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 5, p. 1164–1171, 2009.
- VIJGEN, G. H. E. J. et al. Brown adipose tissue in morbidly obese subjects. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17247, 2011.
- VISSERS, D. et al. The Effect of Exercise on Visceral Adipose Tissue in Overweight Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2013.
- WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 6, p. 697–738, 2000.
- WANG, K. et al. Irisin exerts neuroprotective effects on cultured neurons by regulating astrocytes. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–7, 2018.
- WANG, N. et al. High-intensity interval versus moderate-intensity continuous training: Superior metabolic benefits in diet-induced obesity mice. **Life Sciences**, v. 191, n. 77, p. 122–131, 2017.
- WANG, Q. et al. Brown adipose tissue activation is inversely related to central obesity and metabolic parameters in adult human. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–13, 2015.
- WAYNE, D. et al. Origins of Adipose Tissue and Adipose Regulating Hormones. In: KOVACS, C. P.; DEAL, C. L. (Eds.). **Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management**. [s.l: s.n.]. Academic Press, 2020, p. 663–672.
- WEINHEIMER, E. M.; SANDS, L. P.; CAMPBELLNURE, W. W. A systematic review of the separate and combined effects of energy restriction and exercise on fat-free mass in middle-aged and older adults: Implications for sarcopenic obesity. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 7, p. 375–388, 2010.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.
- WEISS, E. P. et al. Effects of matched weight loss from calorie restriction, exercise, or both on cardiovascular disease risk factors: A randomized intervention trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 3, p. 576–586, 2016.
- WEN, C. P. et al. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: A prospective cohort study. **The Lancet**, v. 378, n. 9798, p. 1244–1253, 2011.
- WESTERTERP, K. R. Control of energy expenditure in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 340–344, 2017.
- WESTERTERP, K. R. Exercise, energy balance and body composition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 9, p. 1246–1250, 2018.
- WHITE, U.; RAVUSSIN, E. Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease

HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 62, n. 1, p. 17–23, 2019.

WHO - World Health Organization. **Physical Status: the use and interpretation of anthropometry**, Switzerland: WHO, 1995, p. 1-452.

WILLEMS, A. E. M. et al. Effects of macronutrient intake in obesity: a meta-analysis of low-carbohydrate and low-fat diets on markers of the metabolic syndrome. **Nutrition Reviews**, v. 79, n. 4, p. 429–444, 2021.

WONG, S. K. et al. Vitamin E as a potential interventional treatment for metabolic syndrome: Evidence from animal and human studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1–12, 2017.

WOODS, S. C. et al. Food intake and the regulation of body weight. **Annual Review of Psychology**, v. 51, p. 255–277, 2000..

WRONSKA, A.; KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta Physiologica**, v. 205, n. 2, p. 194–208, 2012.

WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity Find the latest version : Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 43–54, 2017.

WU, J.; COHEN, PA.; SPIELGEMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? **Genes and development**, v. 27, p. 234–250, 2013.

WU, M. V. et al. Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats: Impact on whole-body energy expenditure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 49, p. 34129–34140, 2014.

WUEEST, S. et al. Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v. 52, n. 3, p. 541–546, 2009.

WUEEST, S. et al. Mesenteric fat lipolysis mediates obesity-associated hepatic steatosis and insulin resistance. **Diabetes**, v. 65, n. 1, p. 140–148, 2016.

XIE, C. et al. Irisin controls growth, intracellular Ca<sup>2+</sup> signals, and mitochondrial thermogenesis in cardiomyoblasts. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–16, 2015.

XIONG, X. Q. et al. FNDC5 overexpression and irisin ameliorate glucose/lipid metabolic derangements and enhance lipolysis in obesity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 9, p. 1867–1875, 2015.

XIONG, X. Q. et al. FNDC5 attenuates adipose tissue inflammation and insulin resistance via AMPK-mediated macrophage polarization in obesity. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 83, p. 31–41, 2018a.

YANG, Z. et al. Decreased irisin secretion contributes to muscle insulin resistance in high-fat diet mice. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 6, p. 6490–6497, 2015.

YEE, K. L.; WEAVER, V. M.; HAMMER, D. A. Integrin-mediated signalling through the MAP-kinase pathway. **IET Systems Biology**, v. 2, n. 1, p. 8–15, 2008.

YI, X. et al. Effects of obesity and exercise on testicular leptin signal transduction and testosterone biosynthesis in male mice. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 4, p. R501–R510, 2017.

YOUNG, P.; ARCH, J. R. S.; ASHWELL, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. **FEBS Letters**, v. 167, n. 1, p. 10–14, 1984.

YU, J. et al. Exercise improved lipid metabolism and insulin sensitivity in rats fed a high-fat diet by regulating glucose transporter 4 (GLUT4) and musclin expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. 1–6, 2016.

ZHAI, X. et al. Elevated B cell activation is associated with type 2 diabetes development in obese subjects. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 1257–1266, 2016.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425–432, 1994.

ZHANG, Y. et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. **Diabetes**, v. 63, n. 2, p. 514–525, 2014.

## 8 ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

Pró Reitoria  
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE IRISINA EM RATOS WISTAR INDUZIDOS A OBESIDADE E FRENTE AO PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBICO", protocolada sob o CEUA nº 7631210617, sob a responsabilidade de **Vanessa de Oliveira Furino e equipe; Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte; Carla Roberta de Oliveira Carvalho; Fernanda de Freitas Anibal** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 18/07/2017.

We certify that the proposal "SERUM CONCENTRATION OF IRISIN IN WISTAR RATS INDUCED OBESITY AND AEROBIC TRAINING PROTOCOL", utilizing 70 Heterogenics rats (70 males), protocol number CEUA 7631210617, under the responsibility of **Vanessa de Oliveira Furino and team; Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte; Carla Roberta de Oliveira Carvalho; Fernanda de Freitas Anibal** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 07/18/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [01/2018](#) a [07/2018](#)

Área: [Centro de Ciências Biológicas E da Saúde](#)

Origem: [Biotério Central da UFSCar](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [40 a 45 dias](#)

N: [70](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [90 a 100 g](#)

Resumo: A obesidade é uma patologia caracterizada pelo aumento de tecido adiposo determinando uma relação sinérgica entre obesidade e inflamação. As principais citocinas envolvidas nesse processo aumentam as chances de serem desenvolvidas Síndrome Metabólica (SM), resistência insulínica (RI), doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes mellitus 2 (DM2). Nesse sentido, ressalta-se a influência do exercício físico que provoca alterações positivas e de correções fisiológicas no músculo e na secreção dos marcadores inflamatórios e reduz o risco de DCV e doenças arteriocoronárias (DAC). Dentre as miocinas secretadas, a irisina além de exercer efeitos benéficos no metabolismo de glicose e lipídios, estimula a termogênese, lipólise e transdiferenciação de adipócitos. Mas, ainda existe na literatura uma lacuna de trabalhos que investiguem o comportamento da irisina frente a obesidade e diabetes. Nesse sentido, o estudo objetiva avaliar o comportamento da produção de irisina durante o desenvolvimento da obesidade e frente ao protocolo de treinamento aeróbico em ratos Wistar. Para tal, ratos machos da linhagem Wistar irão receber dieta hiperlipídica durante 16 semanas. Os grupos serão randomicamente divididos e o grupo exercitado será submetido ao exercício aeróbico por 6 semanas, 3x/semana, em esteira (20m/min) por 60 minutos com intensidade moderada a vigorosa.

Local do experimento: Laboratório de nutrição e metabolismo da Universidade Federal de São Carlos e os ratos permanecerão no biotério do mesmo laboratório localizado no departamento de educação física e motricidade humana

São Carlos, 17 de abril de 2018

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho  
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos