



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Aplicadas



VITOR ROSETTO MUÑOZ

**Efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da proteína
ROCK e regulação da lipogênese e gliconeogênese no fígado de
ratos envelhecidos**

Limeira

2021



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Aplicadas



VITOR ROSETTO MUÑOZ

Efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da proteína ROCK e regulação da lipogênese e gliconeogênese no fígado de ratos envelhecidos

The role of physical exercise on ROCK protein pathway, and lipogenic regulation and gluconeogenesis in the liver of aged rats

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na área de Ciências Nutricionais e Metabolismo.

Orientador: Prof^o. DR. JOSÉ RODRIGO PAULI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO VITOR ROSETTO MUÑOZ, E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ RODRIGO PAULI.

Limeira
2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

M926e Muñoz, Vitor Rosetto, 1993-
Efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da proteína ROCK e regulação da lipogênese e gliconeogênese no fígado de ratos envelhecidos / Vitor Rosetto Muñoz. – Limeira, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: José Rodrigo Pauli.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Envelhecimento. 2. Exercícios físicos. 3. Metabolismo. 4. Quinases associadas a rho. I. Pauli, José Rodrigo, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of physical exercise on ROCK protein pathway, and lipogenic regulation and gluconeogenesis in the liver of aged rats

Palavras-chave em inglês:

Aging

Exercise

Metabolism

Rho-associated kinases

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Doutor em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

José Rodrigo Pauli [Orientador]

Fernando Moreira Simabuco

Luis Osório Silveira Leiria

Adriana Souza Torsoni

João Paulo Gabriel Camporez

Data de defesa: 09-09-2021

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-4280-6558>

- Currículo Lattes do autor: <http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visu>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Vitor Rosetto Muñoz

Orientador: José Rodrigo Pauli

Título: Efeitos do exercício físico sobre a via de sinalização da proteína ROCK e regulação da lipogênese e gliconeogênese no fígado de ratos envelhecidos

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 09/09/2021

Banca examinadora:

1. Prof. Dr. José Rodrigo Pauli (Presidente);
2. Prof. Dra. Adriana Souza Torsoni (Avaliador);
3. Prof. Dr. Fernando Moreira Simabuco (Avaliador).
4. Prof. Dr. João Paulo Gabriel Camporez (Avaliador).
5. Prof. Dr. Luiz Osório Silveira Leiria (Avaliador).

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, não posso iniciar estes agradecimentos sem citar o meu pai e a minha mãe, Adilson e Angela, meus irmãos Raul e Danilo e os demais familiares que me educaram, e me mostraram os valores dessa vida, o caminho da sinceridade, da responsabilidade e do respeito. Vocês são os responsáveis pelas minhas conquistas e eu vou sempre amar vocês!

O início da minha trajetória acadêmica não teria ocorrido se o Professor José Rodrigo Pauli não me aceitasse em seu laboratório em 2014. Após algum tempo trabalhando em seu laboratório pude conquistar a sua confiança e adquirir o prazer em trabalhar no meio científico. Dentro destes anos você tem se tornado um espelho para mim e para os seus alunos devido as suas principais características: a sinceridade, a humildade, o reconhecimento, a sabedoria e acima de tudo, a humanidade. Obrigado mais uma vez por toda a ajuda!

Agradeço também os membros do Laboratório de Biologia Molecular do Exercício, onde tive companheiros de trabalho que me ensinaram a conviver com a diversidade de pensamento. Além disso, aos demais professores que contribuem para a minha formação, Dennys Cintra, Eduardo Ropelle, Adelino Sanchez e Leandro de Moura.

O trabalho duro e os tempos dentro do laboratório não seriam os mesmos sem o suporte amoroso que tive durante estes últimos anos. Por isso, sou extremamente grato e feliz de ter a minha noiva, Beatriz Burger, do meu lado e sempre me apoiando para alcançar os meus objetivos. Aos poucos, estamos realizando os nossos sonhos e tenho certeza que poderemos sonhar cada vez mais, e juntos. Te amo!

Sou grato também aos membros desta banca por colaborarem com este trabalho e com as suas considerações. Aos professores Fernando Moreira Simabuco, Adriana Souza Torsoni, Luiz Osório Silveira Leiria e João Paulo Gabriel Camporez por dedicarem seu tempo a leitura deste trabalho.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para a minha formação (2018/07568-6), a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (OCRC) coordenado pelo Professor Lício Velloso. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Um, lembre-se de olhar para as estrelas e não para baixo, para seus pés. Dois, nunca desista do trabalho. Trabalho dá significado e propósito, e a vida está vazia sem eles. Três, se você tiver sorte o suficiente para encontrar o amor, não o deixe ir embora.”

Stephen Hawking

RESUMO

O envelhecimento é um processo biológico natural que está associado com risco aumentado de desenvolvimento de síndrome metabólica, aparecimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e da esteatohepatite não alcoólica (EHNA). Este risco aumenta em indivíduos sedentários e com expressiva adiposidade. Portanto, a identificação da causa ou fatores disparadores que produzem esses transtornos metabólicos e doenças no fígado poderá auxiliar os profissionais da área da saúde a controlar ou evitar o problema. A proteína ROCK tem se mostrado promissora em atuar sobre a ação da insulina, interferindo no metabolismo, no entanto, seu efeito no tecido hepático ainda não foi totalmente elucidado. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do exercício físico aeróbio sobre a proteína ROCK e seu impacto sobre a sinalização da insulina, lipogênese e gliconeogênese hepática de roedores envelhecidos. Ensaio envolvendo ratos Wistar e Fischer e camundongos C57BL/6J jovens e idosos foram conduzidos. Experimentos com inibidor farmacológico da ROCK (Y-27632) também foram realizados com camundongos. Buscando investigar distúrbios metabólicos vistos com o avançar da idade, experimentos adicionais mimetizando inflamação de baixo grau (lipopolissacarídeos), fibrose (tetracloreto de carbono), hiperinsulinemia (camundongos *Slc2a4^{+/-}*) e obesidade (camundongo Swiss e *Ob/Ob*) fizeram parte da pesquisa. Por fim, experimentos com células hepáticas permitiram avaliar a via de sinalização da insulina em situações de inibição e superexpressão da ROCK e com estímulos de palmitato e insulina. Os resultados mostram que o envelhecimento está associado a um aumento da atividade da ROCK no fígado, independente do grau de adiposidade dos roedores. Ademais, o aumento da atividade da ROCK foi acompanhado de prejuízos na sinalização da insulina e aumento de proteínas envolvidas nos processos de gliconeogênese e lipogênese hepática, com consequente hiperglicemia e maior acúmulo de gordura no fígado. Tais manifestações dismetabólicas foram vistas também em camundongos obesos (Swiss e *Ob/Ob*), camundongos hiperinsulinêmicos (*Slc2a4^{+/-}*) e nas condições de fibrose hepática ou exposição ao lipopolissacarídeos. Por outro lado, verifica-se nas diferentes linhagens de roedores envelhecidos e naqueles expostos a diferentes tratamentos que o exercício físico aeróbio foi capaz de diminuir a atividade da ROCK, melhorar a transdução do sinal da insulina, e isso, foi acompanhado por redução de proteínas-chaves da via da gliconeogênese e lipogênese no fígado. Efeitos similares foram observados através da inibição farmacológica da ROCK (Y-27632) em camundongos C57BL/6J ou em cultivo celular. Nos experimentos em células a inibição da ROCK potencializou a via de sinalização da insulina, e a superexpressão da ROCK1 aumentou o conteúdo da proteína lipogênica SREBP1c. Em conclusão, este é o primeiro estudo a demonstrar que o aumento da atividade da ROCK é associado com prejuízos na sinalização da insulina e aumento dos processos de gliconeogênese e lipogênese no tecido hepático de roedores idosos. Ao contrário, o exercício físico aeróbio foi capaz de suprimir a atividade da ROCK e melhorar a transdução do sinal da

insulina, e isso, foi acompanhado de significativa redução da sinalização envolvida nos processos de gliconeogênese e lipogênese no fígado, seguida de melhora na homeostase glicêmica e menor acúmulo de gordura hepática em roedores envelhecidos.

Palavras-chave: Envelhecimento, exercício físico, metabolismo hepático, Rho-quinase.

ABSTRACT

Aging is a natural biological process that is associated with an increased risk of developing metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). This risk increases in sedentary subjects and with expressive adiposity. Therefore, the identification of the cause or triggering factors of these metabolic disorders and liver disease can help healthcare professionals to control or prevent the problem. The ROCK protein has been promising to act on the insulin pathway, interfering metabolism, however, its effect on liver tissue has not been fully elucidated. The aim of this study was to investigate the effects of aerobic exercise on the ROCK protein and its impact on insulin signaling, lipogenesis, and hepatic gluconeogenesis in aged rodents. Experiments involving young and old Wistar and Fischer rats, and C57BL/6J mice were conducted. Experiments with a pharmacological ROCK inhibitor (Y-27632) were also carried out with mice. Seeking to mimic some metabolic disturbances seen with advancing age, additional experiments inducing low-grade inflammation (lipopolysaccharides), fibrosis (carbon tetrachloride), hyperinsulinemia (Slc2a4^{+/-} mice), and obesity (Swiss and *Ob/Ob* mice) were performed. Finally, experiments with hepatic cells allowed us to assess the insulin signaling pathway in situations of ROCK inhibition and overexpression, and with palmitate and insulin stimuli. The results show that aging is associated with an increase in ROCK activity in the liver, regardless of the adiposity degree of the rodents. Furthermore, the increase in ROCK activity was accompanied by impaired insulin signaling and increased proteins involved in the processes of hepatic gluconeogenesis and lipogenesis, with consequent hyperglycemia and greater hepatic fat accumulation. These dysmetabolic manifestations were also seen in obese mice (Swiss and *Ob/Ob*), hyperinsulinemic mice (Slc2a4^{+/-}), and under conditions of liver fibrosis or exposure to lipopolysaccharides. On the other hand, it is verified in different strains of aged rodents and in those exposed to different treatments that aerobic exercise was able to decrease ROCK activity, improve insulin signal transduction, and this was accompanied by a reduction in key proteins related to gluconeogenesis and lipogenesis pathway in the liver. Similar effects were observed through pharmacological inhibition of ROCK (Y-27632) in C57BL/6J mice or in cell culture. In cell experiments, inhibition of ROCK potentiated the insulin signaling pathway, and overexpression of ROCK1 increased the content of lipogenic protein SREBP1c. In conclusion, this is the first study to demonstrate that increased ROCK activity is associated with impaired insulin signaling and increased gluconeogenesis and lipogenesis processes in the liver tissue of aged rodents. On the other hand, aerobic physical exercise was able to suppress ROCK activity and improve insulin signal transduction, and this was accompanied by a reduction in gluconeogenesis and lipogenesis processes in the liver, followed by improvement in glucose homeostasis and hepatic fat accumulation in aged rodents.

Keywords: Aging, physical exercise, hepatic metabolism, Rho-kinase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. CONEXÃO ENTRE O REPARO CELULAR E A HOMEOSTASE METABÓLICA.	19
FIGURA 2. CARACTERÍSTICAS E CONCEITOS DE IDADE CRONOLÓGICA E BIOLÓGICA.	20
FIGURA 3. MECANISMO DE AÇÃO DA INSULINA EM HEPATÓCITOS.	23
FIGURA 4. MECANISMO DE INATIVAÇÃO E ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA ROCK.	25
FIGURA 5. OBJETIVOS DA ETAPA 1.	32
FIGURA 6. OBJETIVOS DA ETAPA 2.	34
FIGURA 7. OBJETIVOS DA ETAPA 3.	35
FIGURA 8. RATOS WISTAR APRESENTAM MASSA CORPÓREA EXACERBADA DURANTE O ENVELHECIMENTO COMPARADOS AOS RATOS FISCHER.	46
FIGURA 9. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO MELHORA O QUADRO DE HIPERINSULINEMIA, INTOLERÂNCIA À GLICOSE E DE PIORA NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO FÍGADO DE RATOS FISCHER IDOSOS.	47
FIGURA 10. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO CONTRIBUI COM A MELHORA DO ACÚMULO DE GORDURA HEPÁTICA, INFLAMAÇÃO, CONTEÚDO DE ROCK, LIPOGÊNESE E GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA EM RATOS FISCHER IDOSOS.	48
FIGURA 11. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO MELHORA O QUADRO DE HIPERINSULINEMIA, INTOLERÂNCIA À GLICOSE, RESISTÊNCIA À INSULINA, E DE PIORA NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO FÍGADO DE RATOS WISTAR IDOSOS.	49
FIGURA 12. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO CONTRIBUI COM A MELHORA DO ACÚMULO DE GORDURA HEPÁTICA, INFLAMAÇÃO, CONTEÚDO DE ROCK, LIPOGÊNESE E GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA EM RATOS WISTAR IDOSOS.	50
FIGURA 13. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO MELHORA O QUADRO DE INTOLERÂNCIA À GLICOSE, RESISTÊNCIA À INSULINA, E DE PIORA NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS C57BL/6J IDOSOS.	51
FIGURA 14. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO CONTRIBUI COM A MELHORA DO ACÚMULO DE GORDURA HEPÁTICA, INFLAMAÇÃO, CONTEÚDO DE ROCK, LIPOGÊNESE E GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6J IDOSOS.	52
FIGURA 15. INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA ROCK MELHORA O QUADRO DE INTOLERÂNCIA À GLICOSE, RESISTÊNCIA À INSULINA, E DE PIORA NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS C57BL/6J IDOSOS.	53
FIGURA 16. INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA ROCK ATENUA O ACÚMULO DE GORDURA HEPÁTICA, INFLAMAÇÃO, CONTEÚDO DE ROCK, LIPOGÊNESE E GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6J IDOSOS.	54
FIGURA 17. INIBIÇÃO DA ROCK EM CÉLULAS HEPG2 POTENCIALIZA A FOSFORILAÇÃO DA AKT E GSK3B E DIMINUI O CONTEÚDO DE PEPCK E G6PASE.	55
FIGURA 18. HIPERGLICEMIA E HIPERINSULINEMIA PRESENTE EM CAMUNDONGOS <i>SLC2A4^{+/-}</i> ESTÃO ASSOCIADAS COM INTOLERÂNCIA À GLICOSE E À INSULINA E COM A DIMINUIÇÃO NA FOSFORILAÇÃO DA AKT NO FÍGADO.	56
FIGURA 19. CAMUNDONGOS <i>SLC2A4^{+/-}</i> APRESENTAM ACÚMULO DE GORDURA HEPÁTICA E AUMENTO NA ATIVIDADE DA ROCK NO FÍGADO.	57
FIGURA 20. INIBIÇÃO DA ROCK EM CÉLULAS HEPG2 RESISTENTES À INSULINA RESTAURA A FOSFORILAÇÃO DO IRS1 E DA AKT.	58
FIGURA 21. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO INIBE OS EFEITOS NEGATIVOS DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS SOBRE A INTOLERÂNCIA À GLICOSE E ATIVIDADE DA PROTEÍNA ROCK NO FÍGADO.	59
FIGURA 22. EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO REPRIME OS EFEITOS DA FIBROSE HEPÁTICA SOBRE O AUMENTO DA ATIVIDADE DA ROCK NO FÍGADO.	60
FIGURA 23. OBESIDADE GENÉTICA OU INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA AUMENTAM A ATIVIDADE DA ROCK NO FÍGADO E O EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO ATENUA ESTE EFEITO.	61
FIGURA 24. SUPEREXPRESSION DE ROCK1, MAS NÃO ROCK2 INDUZ AUMENTO DA ATIVIDADE DA ROCK E DO CONTEÚDO DE SREBP1C EM CÉLULAS HEPG2.	62
FIGURA 25. RESUMO GRÁFICO DESTA TESE DE DOUTORADO QUE BUSCOU INVESTIGAR O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NA REGULAÇÃO DA PROTEÍNA ROCK NO TECIDO HEPÁTICO NA SITUAÇÃO DE ENVELHECIMENTO. ...	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC - Acetil-CoA carboxilase.
Akt (Protein Kinase B/Akt) - Proteína quinase B.
ALT - Aminotransferase de alanina.
AMPK (AMP-activated protein kinase) - Proteína quinase ativada por AMP.
AST - Aminotransferase de aspartato.
ATP - Adenosina trifosfato.
CCL₄ - Tetracloroeto de carbono
CPT1 α - Carnitina Palmitoiltransferase1 α .
DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2 - Diabetes *Mellitus* do tipo 2.
EHNA - Esteatohepatite não alcoólica.
FAS (Fatty Acid Synthase) – Ácido Graxo Sintase.
SFB – Soro Fetal Bovino.
FoxO1 (Forkhead Box O1) - Fator de transcrição forkhead box O 1.
G6Pase - Glicose 6-fosfatase.
GAP - Proteínas ativadoras de GTPase.
GAPDH - Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase.
GEF - Fator de troca de nucleotídeos de guanina.
GLUT4 (Glucose Transporter 4) - Transportador de glicose do tipo 4.
GSK3 - Glicogênio Sintase quinase 3.
GTT - Teste de Tolerância à Glicose.
IR (Insulin Receptor) - Receptor de insulina.
IRS (Insulin Receptor Substrate) - Substrato do receptor de insulina.
ITT - Teste de Tolerância à Insulina.
MEM - Modified Eagle Medium.
MLCP - Fosfatase da cadeia leve da miosina.
MYPT1 - Miosina Fosfatase Subunidade 1.
NF- κ B (factor nuclear kappa B) - Fator nuclear kappa B.
PBS (Phosphate Bufefred Saline) - Tampão Fosfato Salino.
PCB - Piruvato carboxilase.
PDK (Phosphoinositide-dependent Kinase) - Quinase ativada por fosfoinositídeos.
PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase.
PHG - Produção hepática de Glicose.
PI 3-quinase - Fosfatidilinositol 3-quinase.
Ppar α - Receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa.
PTEN - Fosfatase homóloga à tensina.
PTP-1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) - Proteína Tirosina Fosfatase 1B.
RNA - Ácido ribonucleico.
ROCK (Rho-quinase) - Rho-quinase.
SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase) - Esteril Coa Desaturase.
SH2 - Domínio homólogo Src.
SHP2 - Proteína tirosina fosfatase 2.
SREBP1 (Sterol regulatory element-binding proteins) - Elemento regulador de esterol 2.
TG - Triglicerídeos.
TNF α (Tumor Necrosis Factor alfa) - Fator de necrose tumoral α .

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alpha

β - Beta

® - Registrado

κ - Kappa

μ - Micro

γ - Gamma

T - Treonina

S - Serina

Y - Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:.....	15
2. JUSTIFICATIVA:	17
3. REVISÃO DE LITERATURA:.....	17
3.1. Envelhecimento e metabolismo hepático	17
3.2. O papel metabólico da proteína Rho-quinase	24
3.3. Efeito do exercício físico sobre o metabolismo hepático	27
4. HIPÓTESE:.....	30
5. OBJETIVO GERAL:.....	31
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	31
7. MATERIAIS E MÉTODOS:	35
7.1. Cultura de células.....	35
7.2. Caracterização dos modelos experimentais.....	36
7.3. Protocolo de treinamento físico de natação de curta duração.....	39
7.4. Protocolo de treinamento físico de corrida em esteira de curta duração.....	40
7.5. Protocolo de treinamento físico de corrida em esteira crônico	40
7.6. Eutanásia dos roedores	41
7.7. Quantificação de lipídeos hepáticos	41
7.8. Determinação de fatores séricos	41
7.9. Teste de tolerância à insulina (ITT)	41
7.10. Teste de tolerância a glicose (GTT).....	42
7.11. Extração dos tecidos, homogeneização e determinação do conteúdo de proteínas totais	42
7.12. Immunoblotting	42
7.13. Real Time PCR quantitativo (RT-qPCR)	43
7.14. Análises histológicas	44
7.15. Análise estatística.....	45
8. RESULTADOS:	46
8.1. Ratos Wistar apresentam maior acúmulo de massa corpórea durante o envelhecimento	46
8.2. Exercício físico atenua os prejuízos metabólicas e o aumento do conteúdo da proteína ROCK no fígado de ratos Fischer idosos	46
8.3. Exercício físico aeróbio atenua os prejuízos metabólicas e o aumento do conteúdo da proteína ROCK no fígado de ratos Wistar idosos.....	49
8.4. Exercício físico aeróbio melhora o metabolismo hepático e diminui a atividade da ROCK no fígado de camundongos C57BL/6J idosos	51
8.5. Inibição farmacológica da ROCK melhora o metabolismo hepático e diminui a atividade da ROCK no fígado de camundongos C57BL/6J idosos	53
8.6. Camundongos <i>Slc2a4</i> ^{+/-} apresentam hiperinsulinemia, piores metabólicas e hepáticas, bem como aumento da atividade da ROCK no fígado	55
8.7. Exercício físico aeróbio suprime os efeitos da inflamação de baixo grau induzida por LPS na indução da hiperglicemia, intolerância à glicose, piora na sensibilidade à insulina hepática e aumento na atividade da ROCK no fígado	58

8.8. Exercício físico aeróbio inibe o aumento da atividade da proteína ROCK no fígado em camundongos com fibrose hepática induzida por CCL ₄	59
8.9. Exercício físico aeróbio atenua a atividade da ROCK no fígado de camundongos com obesidade genética ou induzida por dieta hiperlipídica.....	60
9. DISCUSSÃO:.....	63
10. REFERÊNCIAS:	70
11. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REALIZADAS:.....	78

1. INTRODUÇÃO:

Dentro do panorama populacional atual observa-se em grande parte do planeta um aumento no número de pessoas idosas. Além disso, as projeções sinalizam que haverá um envelhecimento contínuo da população mundial nas próximas décadas (1). No Brasil a expectativa segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) é de 26,7% de idosos para o ano de 2060 (www.ibge.gov.br). Uma das grandes preocupações com este cenário é o aumento associado ao processo de senescência em massa da contingência de doenças crônicas degenerativas não transmissíveis como alguns tipos de câncer, distúrbios cardiovasculares e respiratórios, Alzheimer, osteoporose, esteatose hepática não alcoólica e o diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2) (2–4).

Principalmente, projeta-se, que o envelhecimento dentro de um estilo de vida que impera a mesa civilizada farta (alimentos ricos em calorias e gordura saturada) e a inatividade muscular um ambiente propício aos agravos da saúde. Em especial durante o processo de senescência do ser humano diversas alterações ocorrem no organismo e em especial no tecido hepático que estão atrelados a prejuízos em vias moleculares envolvidas no acúmulo exacerbado de gordura (lipogênese) e na produção hepática de glicose descontrolada (glicogenólise e gliconeogênese), e consequentemente isso contribui para a hiperglicemia e o desenvolvimento do DM2 (5,6).

No processo de desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), após a deposição de gordura nos hepatócitos, o dano induzido pelo estresse oxidativo e produção de citocinas pró-inflamatórias contribuem para a instalação da esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) (7). Uma vez instalada, a EHNA é uma importante causa de morbidade e mortalidade, assim como condição para transplante de tecido hepático em humanos. Além disso, considera-se que prejuízos na sensibilidade à insulina tem papel crucial para o agravo do acúmulo de gordura no fígado e o aumento da produção hepática de glicose (PHG) com o avançar da idade (7). No entanto, ainda não é claro se o desenvolvimento da resistência à insulina (condição pré-diabetes) na senescência está associado ao aumento da adiposidade corporal ou ao próprio processo de envelhecimento. Evidências na literatura têm mostrado que a presença de resistência à insulina na velhice parece depender do aumento expressivo de gordura corporal e não necessariamente ao envelhecimento (8,9).

Nesse contexto, diversos estudos têm buscado identificar moléculas com ações regulatórias sobre a via de sinalização da insulina e, por conseguinte sobre a homeostase lipídica e glicêmica. Estudos recentes têm demonstrado o papel da proteína Rho-quinase (ROCK) em mediar a via de sinalização da insulina em diferentes tecidos (músculo esquelético, tecido adiposo, fígado, sistema nervoso central), resultando em alterações metabólicas importantes (10,11). Embora a ROCK apresente efeitos positivos sobre a via de sinalização da insulina no músculo esquelético, algumas evidências demonstram que o efeito desta quinase no tecido hepático pode ser negativo e de

prejuízo sobre a ação intracelular da insulina, sendo uma importante molécula envolvida com a lipogênese no fígado e PHG exacerbada (12–14). Estudo prévio demonstrou que camundongos induzidos a obesidade e tratados com inibidor farmacológico da ROCK (Fasudil) apresentam proteção no ganho de peso e na intolerância à glicose comparado aos camundongos obesos (12). Esta proteção ocorreu devido ao aumento de proteínas relacionadas com a lipogênese e PHG (12). Em outro estudo, foi observado que células hepáticas (HepG2) tratadas com o composto químico Paeoniflorin (PF), de efeito inibitório sobre a ROCK, diminuem o acúmulo de gordura intracelular induzido por palmitato (13). Este composto (PF) apresentou efeitos na diminuição de marcadores lipogênicos e o aumento da via de sinalização da insulina em hepatócitos. Já no estudo de Okin e Medzhitov, foi observado que uma inflamação de baixo grau de maneira sustentada é capaz de causar hiperglicemia em camundongos, sendo esta dependente da atividade da ROCK no tecido hepático (14). Em 2018, foi demonstrado por Huang e colaboradores que o conteúdo de ROCK1 está aumentado no fígado de camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica e em pacientes com acúmulo de gordura hepática (15). Quando a ROCK1 foi deletada especificamente no fígado de camundongos expostos à dieta hiperlipídica, houve proteção ao ganho de peso e ao acúmulo de gordura hepática. Por outro lado, a expressão constitutivamente ativa da ROCK1 especificamente no fígado facilitou o ganho de peso e o acúmulo de gordura hepática em resposta a dieta hiperlipídica (15). Nesse sentido, estes trabalhos têm demonstrado evidências importantes do papel da proteína ROCK sobre o metabolismo hepático, porém, sem enfoque para os efeitos do envelhecimento sobre esta via. Para isso, é necessário entender o papel do envelhecimento nessa nova e potencial via de sinalização hepática e suas possíveis interações com o metabolismo.

Dentre as ações não farmacológicas o exercício físico é uma estratégia importante no controle da DHGNA e na restauração da sensibilidade à insulina periférica, incluindo o fígado em condições de obesidade e envelhecimento (16–19). Estudos já demonstraram que o exercício físico tem efeito positivo no controle do acúmulo de gordura hepática, sendo estes benefícios provenientes de diferentes mecanismos envolvendo a melhora da sensibilidade à insulina, o aumento do gasto energético, a diminuição da adiposidade corporal, entre outros (20–22). Estes efeitos positivos advindos do exercício físico ocorrem devido ações sobre tecidos periféricos e sobre o sistema nervoso central, mas vale ressaltar que o exercício também tem ações cruciais regulando proteínas envolvidas na lipogênese e a gliconeogênese no fígado (16,17,21,23,24). Portanto, investigar os efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre a via de sinalização da ROCK e a regulação da lipogênese e gliconeogênese é de extrema importância para o entendimento da evolução de doenças hepáticas e distúrbios metabólicos em idades avançadas.

2. JUSTIFICATIVA:

O envelhecimento é um problema de saúde pública que está diretamente associado com o aparecimento de doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e doenças hepáticas, gerando altos custos para a economia global. Uma vez que o acúmulo de gordura hepática e o descontrole glicêmico são prevalentes em idosos, o controle da lipogênese e gliconeogênese no fígado é fundamental para a manutenção da homeostase corporal em idades avançadas, prevenindo o aparecimento de doenças associadas a síndrome metabólica. Sendo assim, estratégias capazes de atuar nestes processos do metabolismo hepático durante o envelhecimento são fundamentais. Além disso, a descrição de novos mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo hepático poderá contribuir com o entendimento e desenvolvimento de novas estratégias futuras de saúde pública, com propósito de prevenção e tratamento de doenças na senescência, almejando vidas mais longevas e saudáveis. Neste projeto de doutorado acredita-se em um importante envolvimento da proteína ROCK com a lipogênese e gliconeogênese hepática exacerbada no envelhecimento. Ademais, os efeitos da inibição farmacológica da ROCK e do exercício físico aeróbico em roedores idosos atuando sobre a via de sinalização da ROCK poderão abrir uma nova linha de investigação focada na melhora do metabolismo hepático e da saúde metabólica.

3. REVISÃO DE LITERATURA:

Com base na introdução apresentada, foram revisados tópicos importantes relacionados ao controle da lipogênese e produção de glicose no tecido hepático na situação de envelhecimento, a participação da proteína ROCK sobre a via de sinalização da insulina, e por fim, o efeito do exercício físico na melhora do metabolismo hepático.

3.1. Envelhecimento e metabolismo hepático

Previamente à compreensão da relação entre o processo de envelhecimento e os descontroles sobre o metabolismo hepático, é necessário entender as principais características do envelhecimento. O envelhecimento é caracterizado por uma perda da capacidade funcional ao passar do tempo em grande parte dos organismos vivos (2). De maneira simples, são visíveis as diferenças funcionais entre um indivíduo jovem e um idoso para realização das tarefas diárias. O mesmo pode ser aplicado a qualquer outro mamífero que está em seu estágio inicial e seu estágio final da vida, já que importantes alterações funcionais e comportamentais são observadas. No entanto, é interessante observar que dois indivíduos com características parecidas e com a mesma idade (p. ex.: 75 anos) podem apresentar capacidades funcionais diferentes, como a capacidade de mover algo pesado, ou, por exemplo o padrão/velocidade da marcha. Nesse sentido, o que faz

um indivíduo ser mais ágil e mais eficiente que o outro, mesmo os dois tendo a mesma idade? A explicação destas diferenças pode ser extremamente complicada e extensa, já que os eventos que ocorrem durante a vida podem influenciar diretamente a saúde e as capacidades do indivíduo quando idoso. Porém, é importante evidenciar o conceito de idade biológica e idade cronológica, e como isso se encaixa neste contexto.

Antes de tudo, a evidência de que as pessoas não envelhecem da mesma maneira trouxe à tona o conceito de idade biológica, a qual está relacionada com as atividades funcionais e fisiológicas (25). Já a idade cronológica é simplesmente referente a passagem do tempo. Por exemplo, se uma população é exposta a um fator agressor e estressante (poluição, radiação, etc.) durante grande parte da vida, provavelmente a idade biológica poderá ser mais avançada do que a idade cronológica. Em contraste, um estilo de vida saudável (restrição alimentar, exercício físico, etc.) poderá culminar em uma idade biológica menor que a idade cronológica. Para a definição da idade biológica, é importante ter um olhar mais profundo para as características do envelhecimento. Como revisado por López-Otin em 2013 (2), as principais características do envelhecimento são: 1) instabilidade genômica; 2) atrito telomérico; 3) alterações epigenéticas; 4) perda da proteostase; 5) desregulação nutricional; 6) disfunção mitocondrial; 7) envelhecimento celular; 8) exaustão celular; 9) alterações na comunicação celular. Estes marcadores podem estar alterados de diferentes maneiras em cada indivíduo e podem ajudar na predição da idade biológica. Para isso, o atrito telomérico e as alterações epigenéticas são comumente utilizadas em testes de laboratórios personalizados para calcular a idade biológica.

Os telômeros são sequências de DNA localizadas nas partes finais dos cromossomos, que se encurtam ao passo que as células vão replicando (25). Quando muito curtos (atrito telomérico) há uma sinalização para morte celular devido a senescência celular apresentada na célula em que aquele cromossomo está presente. A replicação desta parte final dos cromossomos pode ser reparada pela enzima telomerase, no entanto, essa enzima apresenta a sua função preservada em apenas alguns tipos celulares em indivíduos já adultos (gametas, células tronco e células tumorais). Como exemplo, a Figura 1 ilustra de maneira rápida uma conexão entre os eventos celulares em um indivíduo jovem e um indivíduo idoso e uma regulação metabólica.



Figura 1. Conexão entre o reparo celular e a homeostase metabólica.

Em indivíduos jovens com um controle ideal dos mecanismos de reparo celular, os danos e estresses não são suficientes para causar a senescência celular, mantendo a homeostase celular e metabólica. Por outro lado, em condições de envelhecimento, onde há um prejuízo nos mecanismos de reparo celular e um maior estresse metabólico, a senescência celular está aumentada e favorecendo o descontrole metabólico. Figura adaptada de Wallace RG et al. (10.1155/2016/2465763).

As alterações epigenéticas são principalmente caracterizadas pelo padrão de metilação DNA e de acetilação das histonas (2). Estes fenômenos ocorrem sem alterar a sequência original do DNA e podem favorecer ou impedir a transcrição genica de regiões específicas do DNA. A metilação é caracterizada pela adição de um radical metil no carbono 5 das bases nitrogenadas de citosina, feita pelas enzimas DNA Metil-Transferases (DNMTs). Quando o DNA é metilado, há o recrutamento de proteínas que atuam na compactação da cromatina, dificultando o papel transcricional da enzima RNA-polimerase, e conseqüentemente diminuindo a tradução proteica referente àquela sequência. Ao mesmo tempo, a acetilação das histonas (proteínas responsáveis pela compactação do DNA) é caracterizada pela adição de um radical acetil no resíduo de lisina das histonas, mediado pelas enzimas Histona Acetil-Transferases (HATs). A acetilação de uma histona irá descompactar a cromatina e favorecer o acesso à molécula de DNA, potencializando a transcrição gênica. As enzimas Histonas Desacetilases (HDACs) tem o importante papel de remover este radical acetil para a compactação da cromatina novamente. Vale ressaltar que as histonas também podem ser metiladas através das enzimas Histonas Metil-Transferases (HMTs), podendo tanto ativar como inibir a transcrição gênica.

O entendimento destas modificações na molécula de DNA nos ajuda a compreender o fato de que as diferentes células do nosso organismo apresentam diferentes características e funções, mesmo sendo compostas pela mesma sequência de DNA. Ao mesmo tempo, contribui para o

entendimento da idade biológica e idade cronológica que pode ser diferente entre cada indivíduo. Por exemplo, um padrão de metilação/acetilação pode colaborar com a transcrição de uma série de genes com funções benéficas para o metabolismo. Em outro indivíduo, este padrão pode ser diferente e favorecer a transcrição de genes com funções maléficas ao organismo. O que é extremamente interessante e animador é que algumas estratégias podem colaborar com a preservação da idade biológica, ou até mesmo revertê-la (26–29). Visto que o envelhecimento biológico pode ser freado, o aparecimento de doenças associadas ao envelhecimento é diminuído, culminando em um envelhecimento saudável. Por outro lado, um envelhecimento prematuro está mais associado com a presença de diferentes tipos de doença e prejuízos metabólicos em idades avançadas (Figura 2).

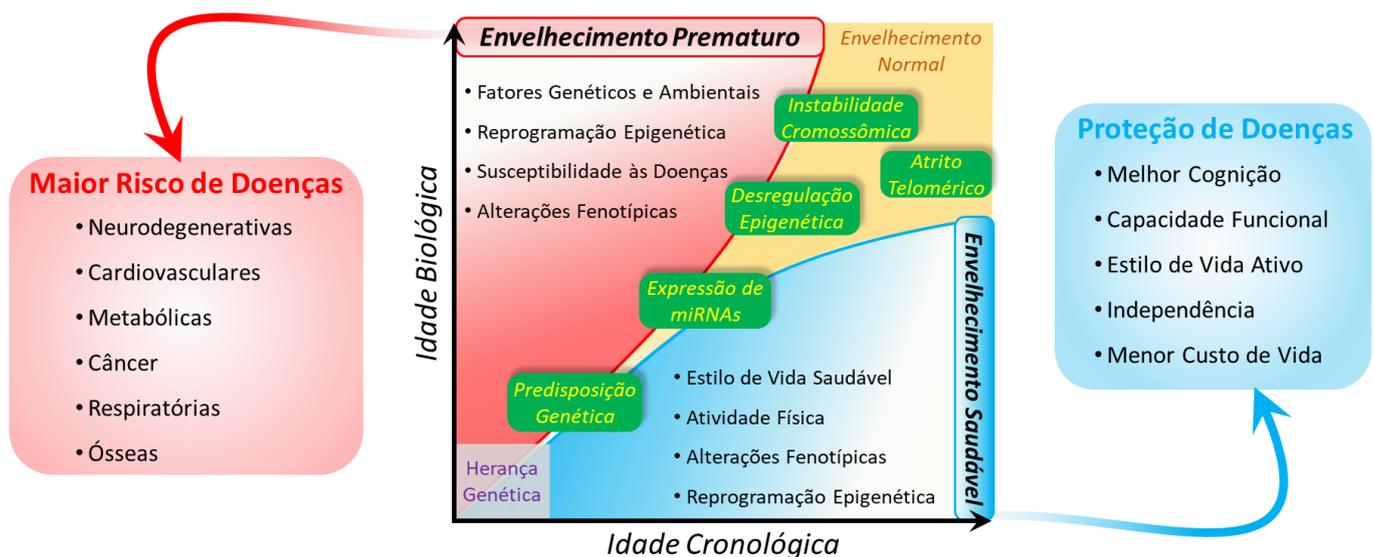


Figura 2. Características e conceitos de idade cronológica e biológica.

As alterações epigenéticas são fundamentais para a determinação da idade biológica. Indivíduos com idade biológica avançada (zona vermelha) apresentam maior risco para doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, metabólicas, alguns tipos de câncer, doenças respiratórias e ósseas. Já uma idade biológica mais atenuada (zona azul) está associada com um envelhecimento mais saudável, melhor capacidade cognitiva e funcional. *Figura de autoria própria.*

Dentre as doenças metabólicas associadas com o envelhecimento a DHGNA têm se tornado a doença hepática mais comum em indivíduos com mais de 60 anos (30). Durante o envelhecimento, o fluxo sanguíneo pode diminuir de maneira expressiva, assim como o volume do tecido hepático (31–33). De maneira importante, através de mapeamento por radioisótopos, é possível observar não só a diminuição da massa do fígado, assim como a perda da funcionalidade das células hepáticas (34). Além disso, o aumento do estresse oxidativo, aumento da inflamação, a senescência celular acelerada, a disfunção mitocondrial, e a diminuição na capacidade de reparo

do tecidual, se tornam fatores importantes no agravamento de doenças relacionadas ao tecido hepático em idades avançadas (35–39). O conjunto destes fatores leva o tecido hepático ao desenvolvimento de fibrose, podendo avançar para o estado mais crítico de cirrose e carcinoma hepatocelular. Porém, o passo inicial para o avanço do aparecimento de fibrose no tecido hepático é a DHGNA, onde ocorre o acúmulo de gordura intracelular. A prevalência de DHGNA é de 15–30% em adultos, com tendência ao aumento após 65 anos (30–40%) (40–42). Além disso, as características do envelhecimento citadas acima (instabilidade genômica, atrito telomérico, alterações epigenéticas, perda da proteostase, desregulação nutricional, disfunção mitocondrial, envelhecimento celular, exaustão celular e alterações na comunicação celular) são pontos fundamentais que podem estar alterados no tecido hepático em idades avançadas (43).

Sendo assim, entender os eventos moleculares que favorecem este acúmulo de gordura hepática durante o processo do envelhecimento é fundamental para pensar em estratégias eficientes na prevenção de doenças hepáticas. Diversos fatores presentes no envelhecimento podem favorecer a DHGNA, porém, devido a relação existente da maior prevalência da DHGNA em indivíduos diabéticos do tipo 2, acredita-se que a resistência à insulina pode ser um fator central para favorecer o acúmulo de gordura hepática.

A insulina é um hormônio essencial para o controle do metabolismo glicídico e lipídico, assim como para a homeostase do tecido hepático. Em resposta ao aumento nos níveis glicêmicos (situação pós-prandial) ocorre a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. Esse polipeptídeo age sobre tecidos periféricos (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo), assim como em nível central (hipotálamo) (44). Os efeitos metabólicos da insulina ocorrem sobre o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, com funções específicas em cada tecido. Basicamente essas funções são: aumento na captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo através do transportador de glicose 4 (GLUT4) (45), aumento na síntese de glicogênio no músculo e fígado (44), supressão da produção hepática de glicose (44), aumento na síntese de ácidos graxos principalmente no fígado (44), inibição da lipólise (46), estimula o armazenamento de triglicerídeos (46), assim como no sistema nervoso central atua em neurônios regulando neuropeptídeos responsáveis pelo controle da ingestão alimentar e do gasto energético (47).

Após sintetizada pelo pâncreas e liberada na corrente sanguínea, o primeiro contato com as células do tecido alvo gerado pela insulina é sobre o seu receptor, o receptor de insulina (IR). O IR é uma proteína alostérica heterotetramérica com atividade quinase intrínseca (44). Por apresentar uma atividade quinase, a subunidade β é responsável pelo início da transdução dos sinais dessa via. A ativação do IR resulta na fosforilação de resíduos específicos do aminoácido tirosina (tyr1158, tyr1162, tyr1163) sobre a própria subunidade β do receptor (IR β). Após a ativação desses resíduos, substratos do receptor de insulina (IRS1/2/3/4) são fosforilados em sítios de tirosina e

exercem a função de continuidade na transdução dessa via ao interagirem com outras proteínas citoplasmáticas (48). A fosforilação em tirosina dos substratos do receptor cria sítios de reconhecimento para domínios de SH2, que se associam a proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-q) e SHP2 ativando-as (48).

Nesse sentido, o mecanismo pelo qual há ativação dos IRS's é que após ocorrer uma mudança na conformação do IR β e sua fosforilação, os substratos são fosforilados em diversos sítios de tirosina, assim como sítios de serina/treonina. A ativação do IRS por estímulo de insulina ocorre através da fosforilação de resíduos de tirosina específicos (tyr608, tyr628, tyr612 e tyr632) (49). Em contraste, alguns resíduos de serina fosforilados nessa molécula apresentam uma ação negativa na via de sinalização da insulina (ser307 e ser 312) (50). Esse fenômeno é caracterizado por um mecanismo de *feedback* regulatório em resposta a uma "hiper-fosforilação" dos resíduos de tirosina em resposta a insulina (51). A ativação do IRS1 resulta na associação física com a proteína fosfoinosítídeo 3-quinase (P13-q), ela por sua vez atua na fosforilação de fosfoinosítídeos de membrana, gerando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Com isso, haverá a translocação da proteína dependente de fosfoinosítídeo 3-quinase (PDK1) para a membrana plasmática e fosforilação da proteína Akt no resíduo de treonina 308 (52). Uma vez parcialmente ativada, a Akt fosforila e ativa o complexo mTORC2, o qual fosforila a Akt no resíduo de ser473 resultando a completa ativação da proteína Akt (53). A ativação da Akt no tecido hepático tem demonstrado fundamental importância devido aos desfechos finais da via de sinalização da insulina neste tecido. Como exemplo destes desfechos finais que ocorrem em resposta ao estímulo de insulina, temos a síntese de glicogênio, a qual ocorre pelo aumento da fosforilação e inibição da proteína Glicogênio Sintase quinase 3 (GSK3) que apresenta papel inibitório sobre a proteína Glicogênio Sintase. Em resposta a insulina, a Akt é capaz de fosforilar o fator de transcrição Forkhead BOX 01 (FoxO1) e impedir que este fator permaneça no núcleo celular transcrevendo genes gliconeogênicos (fosfoenolpiruvato carboxiquinase, PEPCCK e glicose 6-fosfatase, G6Pase) Ao mesmo tempo, em resposta à insulina, a Akt inibe o Complexo TSC 1/2 (TSC1/2) favorecendo o aumento da atividade do complexo mTORC1 o qual ativa o fator de transcrição Sterol Regulatory Element-Binding Proteins 1 (SREBP-1) e com isso culminando em um estímulo para a lipogênese.

Especificamente no fígado, a via de sinalização da insulina atua através da regulação de diferentes proteínas para controlar o metabolismo de glicose e lipídeos. Logo após uma refeição, ocorre o aumento na concentração de insulina na veia porta (presente no fígado) ativando o IR nos hepatócitos (54). Essa ativação está atrelada à continuidade da sinalização intracelular da insulina como descrito anteriormente (pIR/pIRS/pPDK/pAkt) culminando nos seguintes efeitos: 1) No estímulo de glicogênese através da fosforilação da GSK3; 2) Na diminuição da produção hepática de glicose através da fosforilação do fator da FoxO1 e atenuação na transcrição de genes

branco está diretamente relacionada ao aumento da produção hepática de glicose através da PCB; o tecido muscular apresenta prejuízos na síntese de glicogênio e na captação de glicose, fornecendo substrato para o metabolismo hepático; e o aumento de ácidos graxos livres na corrente sanguínea poderão ser reesterificados, favorecendo a síntese de triacilgliceróis no fígado (57,58). Sendo assim, tanto o controle da sensibilidade à insulina em tecidos periféricos como no tecido hepático são fundamentos para o controle do metabolismo de glicose e lipídeos no fígado, sendo que prejuízos na via de sinalização da insulina podem contribuir de maneira fundamental para o acúmulo de gordura hepático e aumento da produção hepática de glicose. Estudos têm demonstrado que a proteína ROCK pode ter um papel chave no controle da via de sinalização da insulina no fígado, e consequentemente controlar a homeostase glicêmica e lipídica (12,14).

3.2. O papel metabólico da proteína Rho-quinase

Por mais que a proteína Rho-quinase (ROCK) seja classicamente conhecida por sua ação estrutural sobre a organização do citoesqueleto celular, alguns estudos nas duas últimas décadas têm demonstrado que esta proteína pode ter importantes efeitos metabólicos (10). A ROCK é uma serina/treonina quinase que possui duas isoformas (ROCK1 e ROCK2), como previamente apresentado (59,60). A ativação da ROCK é mediada por outras proteínas GTPases, como por exemplo a RhoA e a RhoE (61). A RhoA é ativada quando ligada ao GTP, sendo que essa reação é mediada por duas proteínas, a GEF (fator de troca de nucleotídeos guanina) e a GAP (proteína ativadora de GTPase). A GEF é ativada por receptores acoplados a proteína G (GPCR) através da via $G\alpha_q$ e $G\alpha_{12/13}$, e é responsável por realizar a troca de GDP para uma molécula de GTP. Por outro lado, a RhoA é inativada após sofrer ação da GAP, a qual facilita a hidrólise do GTP em GDP. Após ativa, a RhoA/GTP se associa ao domínio de ligação presente na ROCK (Rho-binding domain, RBD) e gera uma mudança em sua conformação, ativando-a e expondo seu domínio quinase, em contrapartida quando há a ligação da RhoE ao terminal N da ROCK ocorre a sua inativação, não exercendo sua atividade quinase (11,62) (Figura 4).

As duas isoformas da ROCK apresentam peso molecular de 160 KDa (11). As funções clássicas dessa proteína são: organização da actina, adesão celular, motilidade celular e vascular, e na contração do músculo liso (63). Quando a ROCK está ativa, ela é capaz de fosforilar diretamente as cadeias leves de miosina (MLC), promovendo interação entre actina e miosina resultando na contração celular. Em adição a ROCK também pode inativar MLC fosfatase (MLCP) através da fosforilação da miosina fosfatase subunidade 1 (MYPT1) nos resíduos de thr696/853 (64). O papel da ROCK na reorganização do citoesqueleto é mediado pela fosforilação e ativação da proteína LIM-quinase (LIMK) no resíduo thr508. Quando ativa, a LIMK fosforila e inativa a proteína Cofilina no resíduo ser3 (65). Os primeiros estudos que envolvem as proteínas da família

Rho foram executados por Chong em 1994, Takai em 1994 e Ridley em 1994, e a partir destes trabalhos surgiram os primeiros indícios que essas proteínas poderiam desencadear sinais intracelulares em diferentes tecidos (66–68).

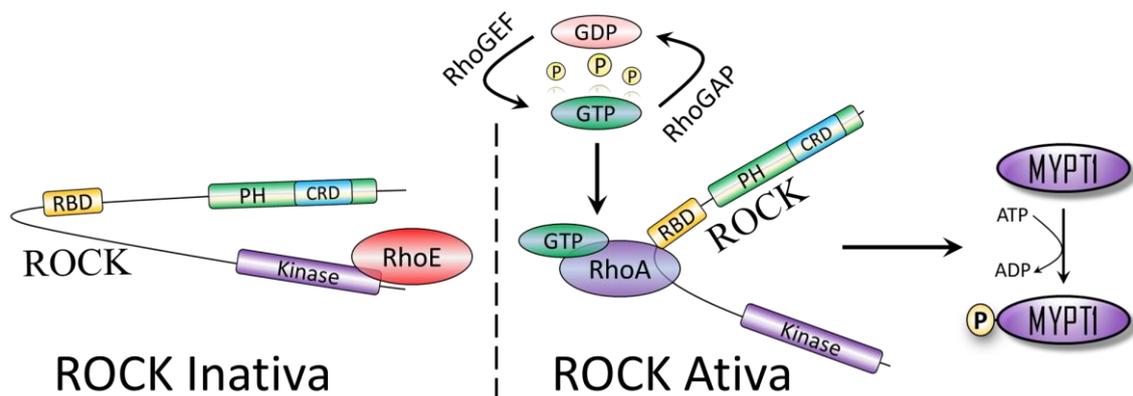


Figura 4. Mecanismo de inativação e ativação da proteína ROCK.

A proteína ROCK é formada por um domínio quinase que se localiza na porção do terminal N, por uma região contendo o domínio de ligação da Rho (Rho-binding domain, RBD) e também uma região carboxi0terminal (C-terminal) com um domínio PH (Pleckstrin-homology). Proteínas da família das Rho's, podem atuar na atividade da ROCK diretamente, por exemplo através da RhoE se ligando ao terminal N e inibindo sua atividade quinase. Por outro lado, a RhoA/GTP pode interagir com o domínio RBD da ROCK e aumentar a atividade quinase dessa proteína.

Figura de autoria própria.

A partir de um breve conhecimento sobre as proteínas da família Rho, foi descoberta uma estreita relação entre RhoA/ROCK com a via de sinalização da insulina, interação sugerida através de um importante estudo por Furukawa em 2005, onde a ROCK poderia atuar sobre o controle glicêmico através da fosforilação da proteína Akt em tecido muscular e em adipócitos. Essa ativação da Akt é consequência da fosforilação do IRS1 nos resíduos de ser632/635, o que potencializou a captação de glicose nesses tecidos (69). Adicionalmente, os autores confirmaram suas hipóteses através da deleção dessa proteína e obtiveram um quadro de diminuição na captação de glicose em células musculares e em adipócitos, assim como resistência à insulina no músculo esquelético (69). Em seguida, Lee em 2009 avaliou os efeitos da inibição da ROCK em camundongos machos e fêmeas, evidenciando que independente do sexo, este modelo tende a desenvolver resistência à insulina, com atenuação na fosforilação do IRS1 em ser632/635 e menor atividade da PI3-q (68). Além disso, o nosso grupo demonstrou recentemente os efeitos do exercício físico aeróbio na regulação da proteína ROCK e sua contribuição para a via de sinalização da insulina no músculo esquelético de ratos jovens e idosos, bem como de camundongos obesos

(70–73). Porém, ao passo que a proteína ROCK apresenta ações positivas no tecido muscular, estudos sugerem que ela pode ter ação negativa em outros tecidos.

No estudo de Lee em 2014, foi demonstrado que camundongos com a deleção da proteína ROCK1 especificamente em adipócitos, tiveram melhora da sensibilidade à insulina no tecido adiposo branco e proteção a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica (74). Em adipócitos, também é sugerido que a proteína ROCK participa de um ciclo vicioso para a instalação de um quadro inflamatório e para a hipertrofia dessas células (75,76). Além disso, a ROCK2 no tecido adiposo pode exacerbar a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica, favorecendo a hipertrofia dos adipócitos e o aumento de citocinas inflamatórias (77,78). Por fim, outras evidências demonstram o aumento da ROCK nos leucócitos circulantes de obesos e que a administração do inibidor farmacológico da ROCK pode melhorar a sensibilidade à insulina (14,79–81). Nesse sentido, estes estudos demonstram evidências de que a ação da proteína ROCK no tecido hepático também pode ser negativa e conseqüentemente participam do aparecimento de doenças hepáticas.

Noda e colaboradores em 2014 demonstraram que o tratamento com inibidor farmacológico para a proteína ROCK (Fasudil) pode proteger sobre o ganho de peso e a intolerância à glicose induzido por dieta rica em gordura (12). Nestes camundongos obesos, foi demonstrado que a inibição da proteína ROCK aumentou genes de oxidação de gorduras (*Ppara* e *Cpt1a*), aumentou um gene de biogênese mitocondrial (*Ppargc1a*), e diminuiu o gene gliconeogênico *G6pc*. Estes eventos foram dependentes da ativação da proteína Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (12). Em outro estudo realizado por Ma e colaboradores em 2017, células hepáticas (HepG2) tratadas com palmitato (para induzir o acúmulo de gordura intracelular) foram tratadas com Paeoniflorin (PF), e apresentaram diminuição no acúmulo de gordura acompanhado da diminuição da atividade da proteína ROCK e da diminuição de marcadores relacionados a lipogênese (SREBP/FAS/PPAR γ /ACC) (13). Adicionalmente, Okin e Medzhotiv em 2016, demonstraram que a proteína ROCK tem ação negativa no tecido hepático por participar de mecanismos inflamatórios. Nesse estudo, é proposto que na presença de TNF α ocorre a ativação do NF- κ B e o acúmulo de metabolitos que estão relacionado a ativação da ROCK, e conseqüentemente o aumento da glicemia de jejum e diminuição da sensibilidade à insulina (14). Sendo assim, tanto a obesidade quanto uma inflamação de baixo-grau induzida por LPS foram eficientes em aumentar a glicemia de jejum através da proteína ROCK. Por outro lado, sua inibição farmacológica (Y-27632) foi positiva na regulação da glicemia de jejum e sensibilidade à insulina (14). No estudo de Huang (2018), primeiramente foi observado que indivíduos com acúmulo de gordura hepático apresentam maior conteúdo de ROCK1 no fígado (15). Em seguida, os autores observaram que a deleção da ROCK1 especificamente no fígado, protegeu sobre o acúmulo de gordura no fígado em resposta a

dieta hiperlipídica. Por outro lado, a expressão constitutivamente ativa da ROCK1 no fígado, potencializou o acúmulo de gordura no fígado em resposta a dieta hiperlipídica. De maneira geral, os autores propõem que a ROCK1 responde a endocanabinóides como o 2-araquidonilglicerol (2-AG) e inibe a atividade quinase da AMPK, resultando em uma programação lipogênica no fígado (15). Por fim, diversos outros estudos demonstram um importante papel negativo da proteína ROCK em condições de doença hepática mais avançada, como a fibrose hepática, cirrose e hepatocarcinoma (82–91).

Visto o papel relevante da proteína ROCK sobre o metabolismo hepático, estratégias capazes de atenuar sua atividade no fígado poderão ser relevantes na prevenção e tratamento de importantes doenças hepáticas. Dentre os tratamentos não-farmacológicos o exercício físico tem grande destaque com efeitos sobre as importantes vias metabólicas em diversos tecidos, tanto periféricos como no sistema nervoso central, permitindo considerar que este também pode atuar sobre a proteína ROCK e regular o processo de inflamação, lipogênese e gliconeogênese no fígado.

3.3. Efeito do exercício físico sobre o metabolismo hepático

Dentre as estratégias utilizadas para a prevenção e o combate da DHGNA, a mudança no estilo de vida e o aumento da atividade física são fatores essenciais, já que nenhuma estratégia farmacológica tem tido grande eficiência no controle desta doença. Como comentado anteriormente, um quadro de resistência à insulina pode ser um fator central no controle da lipogênese e gliconeogênese hepática (92). Por outro lado, diversas evidências demonstram um papel positivo do exercício físico sobre o metabolismo hepático (93–95). Primeiramente, a capacidade cardiorrespiratória, que pode ser utilizada como um parâmetro de nível de atividade física, está negativamente associado com o risco para a DHGNA (96,97). Interessantemente, os benefícios do exercício físico sobre o acúmulo de gordura hepática podem acontecer mesmo sem alterações na massa corpórea. Por exemplo, no caso do exercício físico resistido, tanto adultos como adolescentes apresentaram melhora da DHGNA com alterações corporais mínimas (98–100). Além disso, o exercício físico intervalado de alta intensidade também pode ser prescrito para o tratamento da DHGNA (101). Entretanto, devido à facilidade da prática de exercícios aeróbios de intensidade moderada, há uma maior tolerância e adesão de participantes idosos. O estudo de Thorp e Stine, demonstrou através de uma revisão de literatura que 150 minutos de exercício físico moderado por semana (caminhada, corrida, ciclismo, etc.), foi associado com redução da esteatose e inflamação hepática em pacientes com DHGNA (102). Em um estudo com 37 pacientes com DHGNA, foi observado que o exercício físico aeróbio de intensidade moderada durante 6 meses, foi eficiente em regredir ~66% da esteatose hepática (103). Já no estudo de Zhang e colaboradores,

a comparação entre o exercício físico aeróbio de intensidade moderada ou intensidade vigorosa demonstrou benefícios similares quando comparado estas duas intensidades (104). Outro estudo de meta-análise de Wang e colaboradores, demonstrou através de 9 ensaios clínicos randomizados, com 951 pacientes com DHGNA e sem diabetes, que o treinamento aeróbio foi eficiente em diminuir a enzima aspartato aminotransferase (AST) e reduzir a resistência à insulina (105). No estudo de Sullivan e colaboradores, 18 indivíduos obesos com DHGNA foram submetidos aos protocolos de atividade física recomendados pelo Colégio Americano de Medicina do Esporte, de prática de atividade física moderada de pelo menos 150 minutos por semana (106). Estes indivíduos foram instruídos a se exercitarem por 30-60 minutos, 5 vezes na semana a 45-55% do seu pico de consumo de oxigênio (VO_{2pico}), durante 16 semanas. Nesse sentido, os autores demonstraram uma redução de 10% da esteatose hepática nos indivíduos que realizaram a prescrição de exercício recomendada (106). Além disso, a alteração no estilo de vida que inclui uma dieta hipocalórica e 200 minutos de exercício aeróbio por semana, resultou em uma melhora de 47-72% de parâmetros histopatológicos em indivíduos obesos (107,108).

Os efeitos benéficos do exercício físico sobre a lipogênese no fígado podem estar atrelados a diferentes mecanismos moleculares previamente descritos (92,109). Recentemente, nosso grupo demonstrou que diferentes protocolos de exercício físico (aeróbico, exaustivo, resistido e concorrente) podem modular vias de autofagia no tecido hepático (110,111). Também demonstramos que camundongos obesos submetidos a um protocolo de jejum intermitente combinado ao exercício físico aeróbio crônico apresentaram melhoras significativas sobre o acúmulo de gordura e sobre marcadores de lipogênese e oxidação de lipídeos no tecido hepático (112). Em camundongos que receberam dieta hiperlipídica durante 16 semanas, porém que realizaram exercício físico aeróbio nas últimas 8 semanas de exposição a esta dieta, observamos uma proteção ao acúmulo de gordura hepático (16). Este achado foi acompanhado de um aumento de genes envolvidos na oxidação de gordura e a modulação da proteína Cdc like kinase 2 (CLK2), proteína reguladora da oxidação de gordura e cetogênese hepática (16).

Além do processo de lipogênese hepática, a produção de glicose a partir do fígado também pode ser uma regulação molecular importante para o controle da homeostase glicêmica. O fígado é responsável por 90% da produção endógena de glicose em situações de jejum, sendo que estes níveis flutuam durante o dia (113–115). Por outro lado, após uma refeição rica em carboidratos, o fígado para de produzir glicose, e chega a captar ~4-6 mg/Kg/min de glicose (116,117). Durante o período de jejum noturno, o fígado trabalha em uma taxa de ~2.2 mg/Kg/min de produção de glicose para suprir a quantidade necessária para os outros órgãos (118,119). Já durante um exercício físico de alta intensidade, o fígado pode produzir glicose em uma taxa de 6 mg/Kg/min para suprir a demanda metabólica requisitada pelo músculo em ação (120,121). O controle da

glicemia mediado pelo fígado, depende de uma série de fatores importantes, sendo estes a utilização de glicose por outros tecidos de maneira coordenada e o controle hormonal (principalmente glucagon e insulina). Por exemplo, após uma refeição os níveis de insulina aumentam e há uma supressão da produção hepática de glicose (122). Em contraste, durante o exercício há o aumento nos níveis de glucagon, que estimulam a produção hepática de glicose que será utilizada pelo músculo esquelético (123). Este controle se torna extremamente importante, pois o fígado é o principal órgão que metaboliza a insulina (50-60%) (124). Caso haja algum defeito nos efeitos metabólicos da insulina no fígado, poderá haver um descontrole produção hepática de glicose, resultando em um quadro de hiperglicemia.

Um exemplo do descontrole da PHG pode ser o aumento da glicemia de jejum, já que esta glicose circulante é proveniente principalmente da glicogenólise e da glicose produzida pelo fígado (125,126). Caso haja um quadro de resistência à insulina, poderá haver um aumento na secreção de insulina, para tentar compensar o efeito sobre a supressão da PHG (127). No entanto, quando esta insulina excedente não é suficiente para suprimir a gliconeogênese hepática, haverá um quadro de hiperglicemia de jejum. Este dado é suportado pelos trabalhos que demonstraram aumento da gliconeogênese em indivíduos com glicemia elevada (118,119,128–131). No entanto, vale ressaltar que a glicogenólise é mais responsiva à insulina do que a gliconeogênese, sendo os níveis de glicogênio um fator importante para o controle da glicemia (132,133). Em camundongos com deleção parcial da enzima PEPCK (~40%), houve uma proteção da elevação da PHG em camundongos obesos (134). No entanto, há uma importante discussão sobre a real importância dessas enzimas gliconeogênicas (PEPCK, G6Pase), já que a disponibilidade e o fluxo de substratos no fígado são fundamentais para a PHG (135,136). De qualquer maneira, mudanças no estilo de vida podem diminuir a produção endógena de glicose e melhorar a sensibilidade à insulina no fígado em pacientes DM2 (137).

Indivíduos saudáveis e exercitados, demonstraram uma menor taxa de produção endógena de glicose, comparado aos indivíduos sedentários (138). No entanto, esta menor produção endógena de glicose pode não ocorrer sempre em indivíduos saudáveis, já que provavelmente não há um descontrole hepático (139). Por outro lado, em indivíduos obesos esta regulação pode ser de extrema importância para evitar a hiperglicemia. No estudo de Meex e colaboradores, foi observado que 12 semanas de exercício em cicloergômetro (2 vezes na semana, a 55% da carga máxima) em indivíduos obesos foi eficiente em diminuir a insulinemia de jejum e suprimir a produção endógena de glicose em resposta à insulina (140). O estudo de Shojaee-Moradie também demonstrou dados similares, onde 6 semanas de exercício físico (3 vezes na semana por 20 minutos a 60-85% do VO₂ max) em indivíduos com sobrepeso aumentou o efeito da insulina em suprimir a produção endógena de glicose (141). Uma vez que a aplicação de exercício físico de

maneira crônica parece ser mais eficiente, é importante ressaltar que estes efeitos sobre o metabolismo hepático, podem estar envolvidos com outros efeitos secundários como, por exemplo a perda de peso. Nesse sentido, os estudos de Kirwan e et al. e o estudo de Black et al., demonstraram que 7 ou 6 dias de exercício (50-60 minutos por dia a ~70% do VO₂max), respectivamente, foram eficientes na redução da produção endógena de glicose (142,143). Dessa maneira, ressaltando a importância do exercício físico aeróbio da regulação da PHG, mesmo sem alterações sobre a massa corpórea. Vale ressaltar que outros protocolos de exercício físico (resistido ou intervalado de alta intensidade) também podem atuar sobre o controle da PHG (144).

Nosso grupo demonstrou que tanto o efeito do exercício físico aeróbio quanto o exercício resistido diminuem a PCB hepática, colaborando com a atenuação da hiperglicemia após a indução de obesidade, sendo esta proteína também importante para o controle glicêmico (17,145). Além disso, com o envelhecimento, roedores parecem apresentar prejuízos progressivos sobre o metabolismo hepático, com um aumento da proteína TRB3 (Tribbles Homolog 3) de efeito negativo sobre a via de sinalização da insulina e de marcadores de estresse de retículo, bem como aumento de marcadores gliconeogênicos no fígado (146).

Na situação de obesidade e de envelhecimento o exercício físico tem demonstrado ações positivas sobre a via de sinalização da insulina hepática por atenuar a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP-1B) (18,147). Uma vez que essa proteína está aumentada devido ao processo inflamatório presente no envelhecimento, ela se associa ao IR e ao IRS1 bloqueando a propagação do sinal intracelular de insulina. Nestes estudos, foi demonstrado que roedores obesos ou idosos apresentam o aumento de PTP-1B e sua associação com o IR e IRS1 levando ao aumento de enzimas gliconeogênicas (PEPCK e G6Pase), porém esta resposta é inibida através do exercício físico (18,147). Além destes estudos realizados pelo nosso grupo, outros estudos suportam diversos mecanismos moleculares que podem estar envolvidos com a melhora do metabolismo glicêmico e lipídico em resposta ao exercício físico (148–151).

Por fim, fica evidente o potente papel do exercício físico como estratégia positiva no controle do metabolismo hepático, visto sua ação positiva em organismos obesos, na situação de diabetes do tipo 2 e no envelhecimento. Porém, novos mecanismos moleculares pelo qual o exercício físico age poderão contribuir com a literatura para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas futuras. Nesse sentido, buscamos relacionar o exercício físico como estratégia capaz de atuar sobre a proteína ROCK e com isso na melhora de doenças hepáticas e metabólicas com o envelhecimento.

4. HIPÓTESE:

Devido à grande associação de problemas metabólicos com o envelhecimento, um estilo de vida saudável e a prática de exercício físico é indispensável. Estudos apontam uma importante correlação do envelhecimento com problemas no metabolismo hepático, em especial no acúmulo de lipídeos e uma exacerbação da produção de glicose pelo fígado. Nesse sentido, elaboramos a hipótese de que o envelhecimento pode estar atrelado com o aumento na atividade da ROCK e com distúrbios nos processos de acúmulo de gordura e produção de glicose pelo fígado. Por outro lado, acredita-se que o exercício físico pode ser uma estratégia eficiente para diminuir a atividade da ROCK no fígado e prover benefícios sobre o tecido hepático e sobre o metabolismo de maneira geral.

5. OBJETIVO GERAL:

Investigar os efeitos do exercício físico aeróbio na regulação da via de sinalização da proteína ROCK no fígado e seu papel sobre a sinalização da insulina, lipogênese e produção hepática de glicose em roedores envelhecidos.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos foram dispostos e destacados em três etapas, conforme descrito a seguir. Abaixo de cada lista de objetivos de cada etapa, encontra-se uma figura esquemática em forma de tabela para ilustrar os objetivos específicos.

Etapas 1 – Avaliação dos mecanismos de ação da ROCK em experimentos in vitro

Nesta etapa (Figura 5), foram utilizadas estratégias em cultura celular afim de compreender os mecanismos de ação da ROCK sobre a via de sinalização da insulina, lipogênese e PHG em hepatócitos (células HepG2).

1. Avaliação dos efeitos da inibição da ROCK, através do inibidor farmacológico (Y-27632), em células HepG2 sobre as proteínas envolvidas com a via de sinalização da insulina.
2. Avaliação do conteúdo de ROCK em resposta ao palmitato em células HepG2.
3. Avaliação dos efeitos da superexpressão de ROCK1 e ROCK2 (através de transfecção plasmidial) em células Hepa sobre a lipogênese.
4. Mensuração da atividade da ROCK e proteínas da via da insulina em células com resistência à insulina induzida por exposição prolongada de insulina em células HepG2.

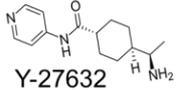
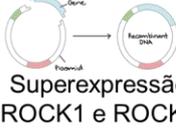
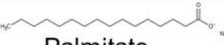
ETAPA 1			
Objetivo	Modelo	Tratamento	Avaliação
1. Inibição farmacológica da ROCK e via de sinalização da insulina	HepG2	 Y-27632	<i>pMYPT1, pAkt, pGSK3</i>
2. Mimetização da hiperinsulinemia e atividade da ROCK	HepG2	 Insulina	<i>ROCK1, ROCK2, pMYPT1, pIRS1, pAkt</i>
3. Superexpressão da ROCK e lipogênese	Hepa	 Superexpressão ROCK1 e ROCK2	<i>ROCK1, ROCK2, pMYPT1, SREBP1</i>
4. Exposição a palmitato e atividade da ROCK	HepG2	 Palmitato	<i>ROCK1, ROCK2, pMYPT1, FAS</i>

Figura 5. Objetivos da Etapa 1.

Etapa 2 – Papel da proteína ROCK sobre os distúrbios metabólicos hepáticos no envelhecimento

Nesta etapa (Figura 6), foram utilizados diferentes modelos de envelhecimento (ratos Wistar e Fischer, camundongos C57BL/6J), bem como um modelo de hiperinsulinemia (*Slc2a4^{+/-}*) a fim de compreender o papel da proteína ROCK sobre a via de sinalização da insulina, lipogênese e produção de glicose (glicogênese e gliconeogênese) no fígado. Cabe ressaltar que a escolha destes dois modelos de ratos deve-se ao fato que o rato Fischer apresenta um aumento menos expressivo de adiposidade em idades avançadas comparado ao modelo Wistar. Este tipo de investigação nos permite observar os efeitos (impacto) da adiposidade corporal no metabolismo hepático durante o processo de envelhecimento. E compreender se as alterações metabólicas no fígado (lipogênese e gliconeogênese) no envelhecimento estão associados necessariamente a obesidade. A utilização de camundongos C57BL/6J permitiu a avaliação dos efeitos do envelhecimento sobre a atividade da proteína ROCK hepática e os efeitos da inibição farmacológica da ROCK nestes camundongos idosos. Além disso, o modelo de camundongos *Slc2a4^{+/-}* tem sido utilizado pelo nosso grupo por apresentar um fenótipo de hiperinsulinemia e intolerância à glicose, independente da exposição a uma dieta hiperlipídica ou ao envelhecimento. As ações na etapa 2, foram as seguintes:

1. Caracterização os efeitos do envelhecimento sobre a composição corporal, marcadores bioquímicos e a homeostase glicêmica nos modelos Wistar e Fischer sedentários e exercitados.

Além disso, foram avaliadas proteínas relacionadas com a via de sinalização da insulina no fígado (pIRS1/pAkt/pGSK3 β).

2. Quantificação dos genes *Rock1*, *Rock2*, *Nfkb*, *Tnfa*, *Ikk*, *G6pase*, *Pepck*, *Pc*, *Cd36*, *Srebp1*, *Fas*, *Cpt1 α* e *Ppara* no fígado de ratos Wistar e Fischer em resposta ao envelhecimento e ao exercício físico aeróbio.

3. Avaliação dos efeitos do envelhecimento e do exercício físico aeróbio sobre a proteína ROCK e as proteínas envolvidas com sua ativação (ROCK1/ROCK2/pMYPT1) e proteínas lipogênicas (SREBP1c e FAS) no tecido hepático de ratos Wistar e Fischer.

4. Caracterização os efeitos do envelhecimento sobre a composição corporal, marcadores bioquímicos e a homeostase glicêmica em camundongos C57BL/6J sedentários e exercitados. Além disso, foram avaliadas proteínas relacionadas com a sensibilidade à insulina hepática (pIRS1/pAkt/pGSK3 β).

5. Mensuração dos genes *Rock1*, *Rock2*, *Tnfa*, *Ikk*, *Nfkb*, *Il1b*, *Ptp1b*, *Pgc1 α* , *G6pase*, *Pepck*, *Pc*, *Fatp4*, *Cd36*, *Srebp1*, *Acc*, *Cpt1 α* e *Ppara* e do conteúdo proteico de ROCK1, ROCK2, pMYPT1, SREBP1c e FAS no fígado de camundongos C57BL/6J sedentários e exercitados.

6. Efeitos da inibição farmacológica (Y-27632) da ROCK sobre o metabolismo glicêmico em camundongos C57BL/6J idosos e avaliação das proteínas pIRS1/pAkt/pGSK3 β no tecido hepático.

7. Efeitos da inibição farmacológica (Y-27632) da ROCK sobre o metabolismo hepático e sobre os genes e proteínas descritos no item 6 em camundongos C57BL/6J idosos.

8. Os efeitos da hiperinsulinemia sobre o metabolismo glicêmico e hepático em camundongos *Slc2a4^{+/-}*, bem como a da atividade da proteína ROCK no fígado destes camundongos.

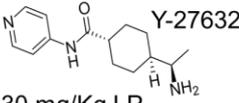
ETAPA 2			
Objetivo	Modelo	Tratamento	Avaliação
1. Parâmetros metabólicos em resposta ao envelhecimento e exercício físico	 Wistar e Fischer	 Envelhecimento: 17 meses Exercício: 7 dias/natação	<ul style="list-style-type: none"> Glicemia, insulina, HOMA-IR, GTT, ITT, TG, Colesterol, ALT, AST pIRS1, pAKT, pGSK3 Histologia, TG e Colesterol hepático
2. Marcadores gênicos de inflamação hepática, metabolismo lipídico e gliconeogênese			<ul style="list-style-type: none"> Via da ROCK: Rock1, Rock2 Inflamatórios: Nfkb, Tnfa, Ikk Metabolismo lipídico: Cd36, Srebp1, Fas, Cpt1a, Ppara Gliconeogênese: G6p, Pepck, Pc
3. Via da ROCK e lipogênese em resposta ao envelhecimento			<ul style="list-style-type: none"> Via da ROCK: ROCK1, ROCK2, pMYPT1 Lipogênese: SREBP1 e FAS
4. Parâmetros metabólicos em resposta ao envelhecimento e exercício físico	 C57BL/6J	 Envelhecimento: 14 meses Exercício: 7 dias/esteira	<ul style="list-style-type: none"> Glicemia, insulina, HOMA-IR, GTT, ITT, TG, Colesterol, ALT, AST pIRS1, pAKT, pGSK3 Histologia, TG e Colesterol hepático
5. Marcadores gênicos de inflamação hepática, metabolismo lipídico e gliconeogênese			<ul style="list-style-type: none"> Genes: <ul style="list-style-type: none"> Via da ROCK: Rock1, Rock2 Inflamatórios: Nfkb, Tnfa, Ikk, Il1b, Ptp1b Metabolismo lipídico: Fatp4, Cd36, Srebp1, Acc, Cpt1a, Ppara Gliconeogênese: Pgc1a, Pcx, Pepck, G6p, Pc Proteínas: <ul style="list-style-type: none"> Via da ROCK: ROCK1, ROCK2, pMYPT1 Lipogênese: SREBP1 e FAS
6 e 7. Inibição farmacológica da ROCK em camundongos idosos sobre o metabolismo hepático lipídico e glicêmico	 Slc2a4 ^{+/-}	 30 mg/Kg I.P. durante 7 dias	<ul style="list-style-type: none"> Glicemia, insulina, HOMA-IR, GTT, ITT, TG, Colesterol, ALT, AST pIRS1, pAKT Histologia, TG e Colesterol hepático
8. Efeitos da hiperinsulinemia sobre a via da ROCK no tecido hepático			<ul style="list-style-type: none"> Genes: <ul style="list-style-type: none"> Via da ROCK: Rock1, Rock2 Metabolismo lipídico: Cd36, Srebp1, Fas Proteínas: <ul style="list-style-type: none"> Via da ROCK: ROCK1, ROCK2, pMYPT1 Lipogênese: SREBP1 e FAS

Figura 6. Objetivos da Etapa 2.

Etapa 3 – Efeitos de diferentes estresses metabólicos sobre a proteína ROCK no tecido hepático

Uma vez que o envelhecimento está associado com outros distúrbios metabólicos, na Etapa 3, buscamos diferentes tipos de estresses metabólicos que estão atrelados a alterações hepáticas. Para isso, a mimetização de uma inflamação de baixo grau (com LPS), a indução de fibrose hepática (com CCL₄, Tetracloreto de carbono) e o uso de camundongos com obesidade genética (*Ob/Ob*) ou induzida por dieta hiperlipídica (DHL) podem ser situações importantes associadas com a atividade da ROCK no tecido hepático (Figura 7).

1. Avaliação dos efeitos da inflamação de baixo grau induzida por LPS (3 semanas) sobre o metabolismo glicêmico, hepático e sobre a atividade da proteína ROCK no fígado de camundongos C57BL/6J sedentários e exercitados.

2. Avaliação dos efeitos da fibrose hepática induzida por CCL₄ (12 dias) sobre o metabolismo hepático e atividade da proteína ROCK no fígado de camundongos C57BL/6J sedentários e exercitados.

3. Avaliação da atividade da proteína ROCK no fígado de camundongos Swiss alimentados com uma dieta hiperlipídica (DHL) e camundongos *Ob/Ob* sedentários e exercitados.

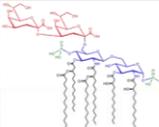
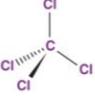
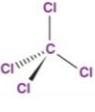
ETAPA 3			
Objetivo	Modelo	Tratamento	Avaliação
1. Indução de inflamação de baixo grau com LPS		 LPS: 1.5 mg/Kg por 3 semanas Exercício: 7 dias/esteira	<ul style="list-style-type: none"> • Glicemia, GTT, ALT, AST • pIRS1, pAKT • Histologia • Via da ROCK: ROCK1, ROCK2, pMYPT1
2. Indução de fibrose hepática com CCL ₄	C57BL/6J	 CCL ₄ : 1 mL/Kg por 12 dias Exercício: 7 dias/esteira	<ul style="list-style-type: none"> • Massa corpórea, peso do fígado, ALT, AST • Histologia • Via da ROCK: ROCK1, ROCK2, pMYPT1
3. Via da ROCK e lipogênese em resposta ao envelhecimento	 Swiss  <i>Ob/Ob</i>	 DHL: 12 semanas <i>Ob/Ob</i> Exercício: 4 semanas/esteira	<ul style="list-style-type: none"> • Via da ROCK: ROCK1, ROCK2, pMYPT1

Figura 7. Objetivos da Etapa 3.

7. MATERIAIS E MÉTODOS:

7.1. Cultura de células

Células HepG2 e Hepa 1C1C7 foram cultivadas em MEM (Modified Eagle Medium) ou alfa MEM contendo 10 % de SFB (Soro Fetal Bovino) a 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO₂ em condições estéreis. Para superexpressão da proteína ROCK2, foi utilizado um plasmídeo GFP-mROCK2 obtido da Addgene® (#101296), onde o gene da ROCK2 foi clonado em um vetor pEGFP-C1. O plasmídeo utilizado para superexpressão da ROCK1 (GFP-ROCK1, vetor EGFP-C) foi um presente da pesquisadora Suzie Verma da Universidade de *Queensland*. Os plasmídeos foram amplificados segundo técnicas de biologia molecular descritas por Sambrook e Russell, 2001 (152). Para transfecção, células Hepa 1C1C7 foram plaqueadas em placas de 6 *wells* (~70% confluência) e foi adicionado 100 µL de MEM sem soro com 1 µg de DNA plasmidial e 6 µL do reagente PLUS (Thermofisher Scientific®, #15338100), e seguido de incubação por 15 min. A essa mistura foram

adicionados 100 μ L de MEM sem soro combinado com 4 μ L de Lipofectamina (ThermoFisher Scientific®, #15338100), seguido de incubação por 15 min. As células foram lavadas com MEM sem soro e cobertas com 800 μ L de meio sem soro, e os 200 μ L da solução contendo DNA, reagente PLUS e Lipofectamina foram adicionados. Após 3 horas, o meio foi trocado por MEM com 10% de SFB e as células foram incubadas por 48 horas. Parte destas células foram tratadas com palmitato (400 μ M por 24 h) para avaliação de proteínas lipogênicas. Para a inibição farmacológica da ROCK, células HepG2 foram tratadas com o inibidor farmacológico para ROCK1 e ROCK2 (Y-27632) a 10 μ M durante 4 horas, e estimuladas com insulina (20 nM) por 15 minutos. As células foram lavadas com PBS e os extratos proteicos coletados em tampão de lise (Tris pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton 1 %) contendo cocktail de inibidores de protease e fosfatase (Sigma®). Os extratos foram avaliados por immunoblotting para avaliar a modulação de vias específicas relacionadas à via de sinalização da insulina e lipogênese. Células HepG2 também foram estimuladas com palmitato (400 μ M por 24 h) e foi avaliado o conteúdo de gordura intracelular e a atividade da ROCK por immunoblotting. Para avaliação do conteúdo de gordura intracelular nas células, foi utilizado o corante Oil Red durante 1 hora, então estas células foram lavadas com água destilada e avaliadas através de microscópio. Para quantificação, foi adicionado 1 mL de isopropanol no meio de cultura e a absorbância foi mensurada a 540 nm. A indução de resistência à insulina através de uma exposição prolongada de insulina foi realizada em células HepG2 com a adição de insulina ao meio na dose de 100 nM por 24 horas e incubação com o inibidor da ROCK (Y-27632) nas últimas 4 horas (10 μ M). Após este período, foi feito um novo estímulo de insulina (20 nM) por 15 minutos, em seguida as células foram coletadas para análises proteicas.

7.2. Caracterização dos modelos experimentais

Foram utilizados ratos Fischer 344 e ratos Wistar inicialmente com 4 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Unicamp (CEMIB). O modelo de animal Fischer 344 é considerado um importante modelo para o estudo do metabolismo e envelhecimento, devido a menor acúmulo de gordura corporal ao longo da vida, por outro lado, o modelo Wistar apresenta aumento acentuado de gordura corporal em idades avançadas (66,67). Além destes dois modelos, foram utilizados camundongos C57BL/6J, camundongos Swiss, camundongos *Ob/Ob* e camundongos geneticamente modificados com deleção global do gene *Slc2a4*. Este modelo foi utilizado quando heterozigoto (*Slc2a4^{+/-}*), por apresentar um quadro de hiperinsulinemia e intolerância à glicose.

Todos os experimentos com roedores foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008). Antes do início da prática

experimental todos os protocolos experimentais foram submetidos à apreciação da Comissão de Ética no uso de Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas, da UNICAMP – Campinas-SP (n° 4531-1/2017, 5584-1/2020, 5753-1/2021, 5003-1/2018, 5583-1/2020). Os roedores foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais sob as condições controladas de ciclo claro-escuro (12/12h) com livre acesso à água e ração convencional, luz ligada às 06:00h e desligada às 18:00h, com temperatura controlada em $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa mantida em 45-55% e ruídos no local inferiores a 85 decibéis. Foram utilizadas lâmpada de 100 W durante o período claro do dia (Phillips® soft white light; 2700 K; 565-590 nm; 60 lux). Os modelos experimentais foram utilizados com idade de 3-5 meses (referente a ~20 anos em humanos) e os idosos de 14-17 meses (referente a ~60 anos em humanos), como descrito por Dutta e Sengupta (153).

Os modelos de ratos Fischer 344 e Wistar foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- Jovem: roedores com 3-5 meses e sedentários (n=7);
- Idoso Sedentário: roedores (17 meses) sedentários (n=7);
- Idoso+Exercício: roedores (17 meses) exercitados submetidos ao protocolo de treinamento de natação de curta duração (n=7);

Os modelos de camundongos C57BL/6J foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- Jovem: roedores com 3-5 meses e sedentários (n=7);
- Idoso Sedentário: roedores (14 meses) sedentários (n=7);
- Idoso+Exercício: roedores (14 meses) exercitados submetidos ao protocolo de treinamento de esteira de curta duração (n=7);

Para inibição da ROCK em camundongos C57BL/6J, foram utilizados os seguintes grupos:

- Idoso Sedentário: roedores (14 meses) sedentários com injeção intraperitoneal de PBS 1x durante 7 dias (n=7);
- Idoso+Y-27632: roedores (14 meses) e sedentários que receberam o inibidor farmacológico da ROCK (Y-27632 via intraperitoneal a 30 mg/Kg durante 7 dias).

Os camundongos *Slc2a4*^{+/-} foram distribuídos nos grupos:

- Wild-Type (WT): camundongos (8 meses) sem deleção parcial do gene *Slc2a4* e sedentários (n=5);
- *Slc2a4*^{+/-}: camundongos (8 meses) heterozigotos e sedentários (n=5);

- *Slc2a4*^{+/-}+Exercício: camundongos (8 meses) heterozigotos submetidos ao treinamento de esteira de curta duração (n=5).

Para indução de inflamação de baixo grau, camundongos C57BL/6J foram distribuídos nos grupos:

- Controle (CTL): camundongos (4 meses) sedentários com injeção intraperitoneal de PBS 1x durante 3 semanas (n=5);
- LPS: camundongos (4 meses) sedentários que receberam injeção intraperitoneal de LPS (1.5 mg/Kg) durante 3 semanas (n=6);
- LPS+Exercício: camundongos (4 meses) exercitados (7 dias em esteira) que receberam injeção intraperitoneal de LPS (1.5 mg/Kg) durante 3 semanas (n=6).

Para indução de fibrose hepática camundongos C57BL/6J foram distribuídos nos grupos:

- Controle (CTL): camundongos (4 meses) que receberam injeção intraperitoneal de veículo (óleo de oliva) durante 12 dias a cada 48 horas;
- CCL₄: camundongos (4 meses) sedentários que receberam injeção intraperitoneal de CCL₄ (1 mL/Kg diluído em óleo de oliva) durante 12 dias a cada 48 horas;
- CCL₄+Exercício: camundongos (4 meses) exercitados (7 dias em esteira) que receberam injeção intraperitoneal de CCL₄ (1 mL/Kg diluído em óleo de oliva) durante 12 dias a cada 48 horas.

Para avaliação dos efeitos da obesidade genético ou induzida por dieta hiperlipídica, camundongos *Swiss* e *Ob/Ob* foram distribuídos nos seguintes grupos:

- CTL: camundongos *Swiss* (5 meses) alimentados com dieta padrão e sedentários;
- DHL: camundongos *Swiss* (5 meses) sedentários alimentados com uma dieta hiperlipídica (DHL durante 12 semanas);
- DHL+Exercício: camundongos *Swiss* (5 meses) exercitados (4 semanas em esteira) e alimentados com uma dieta hiperlipídica (DHL durante 12 semanas);
- Wild-Type (WT): camundongos (5 meses) controle alimentados com dieta padrão;
- *Ob/Ob*: camundongos (5 meses) com deficiência na produção de leptina (*Ob/Ob*) sedentários e alimentados com dieta padrão;
- *Ob/Ob*+Exercício: camundongos (5 meses) com deficiência na produção de leptina (*Ob/Ob*) exercitados (4 semanas em esteira) e alimentados com dieta padrão.

Como exemplo, abaixo encontra-se uma tabela com a descrição dos modelos experimentais e grupos em que foram distribuídos:

Modelo Experimental	Grupo		
Fischer 344 e Wistar	Jovem (n=7)	Idoso (n=7)	Idoso+Exe (n=7)
<i>Detalhes:</i>	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (3-5 meses) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Idosos (17 meses) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Idosos (17 meses) Exercitados (7 dias/natação)
C57BL/6J	Jovem (n=7)	Idoso (n=7)	Idoso+Exe (n=7)
<i>Detalhes:</i>	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (3-5 meses) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Idosos (14 meses) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Idosos (14 meses) Exercitados (7 dias/esteira)
C57BL/6J	Idoso (n=7)	Idoso+Y-27632 (n=7)	
<i>Detalhes:</i>	<ul style="list-style-type: none"> Idosos (14 meses) PBS (Veículo) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Idosos (14 meses) Y-27632 (30 mg/Kg por 7 dias) Sedentários 	
C57BL/6J	CTL (n=5)	LPS (n=6)	LPS+Exe (n=6)
<i>Detalhes:</i>	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (4 meses) PBS (Veículo) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (4 meses) LPS (1.5 mg/Kg por 3 semanas) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (4 meses) LPS (1.5 mg/Kg por 3 semanas) Exercitados (7 dias/esteira)
C57BL/6J	CTL (n=5)	CCL₄ (n=6)	CCL₄+Exe (n=6)
<i>Detalhes:</i>	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (4 meses) Óleo de Oliva (Veículo) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (4 meses) CCL₄ (1 mL/Kg por 12 dias a cada 48 horas) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (4 meses) CCL₄ (1 mL/Kg por 12 dias a cada 48 horas) Exercitados (7 dias/esteira)
Swiss	CTL (n=5)	HFD (n=5)	HFD+Exe (n=5)
<i>Detalhes:</i>	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (5 meses) Dieta padrão Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (5 meses) Dieta rica em gordura (HFD 12 semanas) Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (5 meses) Dieta rica em gordura (HFD 12 semanas) Exercitados (4 semanas/esteira)
Ob/Ob	WT (n=5)	Ob/Ob (n=5)	Ob/Ob+Exe (n=5)
<i>Detalhes:</i>	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (5 meses) WT Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (5 meses) Ob/Ob Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (5 meses) Ob/Ob Exercitados (4 semanas/esteira)
Slc2a4^{+/-}	WT (n=5)	Slc2a4^{+/-} (n=5)	Slc2a4^{+/-}+Exe (n=5)
<i>Detalhes:</i>	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (8 meses) WT Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (8 meses) Slc2a4^{+/-} Sedentários 	<ul style="list-style-type: none"> Jovens (8 meses) Slc2a4^{+/-} Exercitados (7 dias/esteira)

Tabela 1. Distribuição e características dos grupos experimentais.

O protocolo de exercício físico aeróbio (treinamento de curta duração) adotado para cada experimento está descrito abaixo nos próximos itens.

7.3. Protocolo de treinamento físico de natação de curta duração

Previamente ao protocolo de treinamento físico os ratos Wistar e Fischer do grupo exercício foram adaptados ao meio líquido durante seis dias. No primeiro dia os ratos foram colocados por 10 minutos em água com nível até o tórax. No segundo dia o nível de água foi o mesmo e a duração de 20 minutos. No terceiro dia os ratos foram colocados em tanques com nível máximo de 50 cm

durante 2 minutos. No quarto dia a duração foi de 5 minutos mantendo o nível de água. No quinto dia, com o mesmo nível de água, a duração da adaptação foi de 10 minutos, sendo que no último e sexto dia a duração foi de 15 minutos com tanque cheio. Este período de adaptação ao meio líquido teve por objetivo a adaptação ao nado bem como a redução do estresse destes ratos. Após o período de adaptação, os roedores descansaram por um dia, e então no próximo dia foi iniciado o protocolo de exercício físico como descrito a seguir.

Tanto para a adaptação quanto para o protocolo de exercício físico, foram utilizados tanques cilíndricos com 60 cm de diâmetro interno e 70 cm de profundidade com água morna (temperatura de 32-33 °C). O exercício físico consistiu em sete dias de exercício, sendo que em cada dia os ratos foram submetidos a quatro sessões de 30 minutos de nado separados por 10 minutos de descanso. Este protocolo foi adaptado de Kawanaka et al. (154) e previamente utilizado pelo nosso grupo de pesquisa (70). Após 16 horas da última sessão de exercício os ratos foram eutanasiados para extração do tecido hepático.

7.4. Protocolo de treinamento físico de corrida em esteira de curta duração

Nos experimentos envolvendo camundongos C57BL/6J (camundongos idosos e tratados com LPS ou CCL₄) foi realizado um protocolo de treinamento em esteira de curta duração (7 dias). Para isso, os camundongos foram adaptados em esteira rolante para roedores durante 5 dias (10 min a 6 m/min). Em seguida, foram submetidos ao teste de carga incremental para obtenção da velocidade de exaustão. Este teste foi iniciado na velocidade de 6 m/min com incrementos de 3 m/min a cada 3 minutos até o animal atingir a sua exaustão. Sendo assim, a intensidade de 60% da velocidade de exaustão foi adotada para cada camundongos. Os camundongos realizaram 7 dias de exercício físico nesta intensidade (~ 14 m/min) por 1 hora a cada dia.

7.5. Protocolo de treinamento físico de corrida em esteira crônico

Os camundongos *Swiss* (DHL) e *Ob/Ob* foram primeiramente submetidos ao tempo de indução de obesidade (8 semanas) e iniciaram o protocolo de exercício físico em esteira crônico (4 semanas), totalizando 12 semanas de experimento. Assim como descrito anteriormente, foi realizado um período de adaptação prévio ao exercício físico (5 dias, por 10 min a 6 m/min), seguido de um teste de carga incremental. Foi adotada a intensidade de 70% da velocidade de exaustão, sendo que os camundongos realizaram 4 semanas de exercício físico com duração de 30 minutos na primeira semana, 45 minutos na segunda semana e 60 minutos na terceira e quarta semana, 5 dias na semana. Para os camundongos *Ob/Ob*, foi adotado o mesmo período de 4 semanas de exercício com o mesmo volume de corrida nas 4 semanas. No entanto, devido à dificuldade de locomoção destes camundongos a intensidade de corrida adotada foi de ~8 m/min.

7.6. Eutanásia dos roedores

Previamente aos procedimentos cirúrgicos e de extração dos tecidos, os roedores receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina cloridrato (40-87 mg/kg; Ketalar; Parke-Davis®, Ann Arbor, MI) e xelazina (5-13 mg/kg; Rompun; Bayer®, Leverkusen), e foram eutanasiados por decapitação após a realização de todos os procedimentos previstos (descritos a seguir). Todos os roedores permaneceram em jejum de 6 horas antes dos procedimentos de extração dos tecidos. A massa corpórea dos animais foi avaliada previamente a extração utilizando balança analítica (Gehaka, BK4001).

7.7. Quantificação de lipídeos hepáticos

A extração de lipídeos hepáticos foi realizada de acordo com o método de Folch (155), onde 50 mg de fígado foi homogeneizado com 950 uL de solução clorofórmio:methanol (2:1), e adicionado 200 uL de metanol sobre a amostra, para posterior centrifugação (3000 rpm durante 10 min). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 400 uL de clorofórmio e 320 uL de NaCl 0,73%. As amostras foram centrifugadas novamente a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e lavado três vezes com 300 uL de solução de Folch (3% clorofórmio, 48% metanol, 45% H₂O e 2% NaCl 0,2%) com rápida centrifugação entre as lavagens (~3 min a 3000 rpm). Novamente o sobrenadante foi descartado e a fase intermediária foi secada a 37 °C overnight. O extrato lipídico foi resuspenso com 500 uL de isopropanol a leitura de triglicérides e colesterol foram realizadas através de Kit calorimétrico (Laborlab®, São Paulo, Brazil).

7.8. Determinação de fatores séricos

Após 6 horas de jejum, o sangue foi coletado a partir da veia calda (corte distal) e centrifugado (12000 rpm por 3 min) para obtenção do soro e armazenado em -80 °C. Posteriormente foram avaliados os níveis de insulina (RayBiotech®, Norcross, GA; #ELM-Insulin) para determinação do índice HOMA-IR (glicemia de jejum (mmol/L) x insulinemia de jejum (μU/mL)/22.5). Os níveis de triglicérides (TG), colesterol, aminotransferase de aspartato (AST) e aminotransferase de alanina (ALT) foram mensurados com kits comerciais (Laborlab®, São Paulo, Brazil).

7.9. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Com jejum prévio de 6 horas e após 16 horas da última sessão de treinamento físico, os ratos foram submetidos ao teste de tolerância à insulina (ITT). Para isso, os roedores receberam injeção intraperitoneal de insulina recombinante humana (Humulin R) da Eli Lilly® (Indianápolis, IN, USA) na concentração de 1,5 U/kg de massa corporal. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a partir da cauda dos roedores para a determinação da glicose sanguínea. Os valores de glicemia obtidos durante o teste foram determinados com o equipamento Accu-Check Active (Roche®, Switzerland). O tempo 0 representa o valor basal de glicose dos roedores e que antecede a injeção de insulina. A área sob a curva foi calculada em cada grupo experimental.

7.10. Teste de tolerância a glicose (GTT)

Após jejum prévio de 6 horas e após 16 horas da última sessão de treinamento físico, foi realizado corte distal na cauda dos roedores para ser efetuada a primeira coleta de sangue para a dosagem basal de glicose, o que equivale ao tempo zero (t₀) do teste e a glicemia de jejum. Logo após, foi aplicado via intraperitoneal (i.p.) solução de glicose a 50% (2 g/Kg de peso corporal), com posteriores coletas de amostras sanguíneas nos tempos 30, 60 e 120 minutos, para as dosagens da glicemia. Em seguida, a área sob a curva foi calculada em cada grupo experimental. Os valores de glicemia obtidos durante o teste de GTT foram determinados com o equipamento Accu-Check Active (Roche®, Switzerland).

7.11. Extração dos tecidos, homogeneização e determinação do conteúdo de proteínas totais

Amostras do tecido hepático foram retiradas após injeção de 0,2 mL de salina ou insulina (10^{-6} mol/L) na veia porta. Após 30 s da injeção de insulina, amostras do fígado foram retiradas. Posteriormente, elas foram homogeneizadas em tampão de extração como descrito anteriormente (70). Parte deste foi utilizada para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método do ácido bicinconínico, enquanto que a outra parte foi submetida à imunoblotting com anticorpos específicos, de acordo com estudos prévios (70).

7.12. Immunoblotting

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, foi acrescentado tampão de Laemmli ao sobrenadante contendo 100 mM de DTT (156), e então aquecido por 5-10 minutos. Em seguida, quantidades iguais de proteínas (30 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Após a corrida em gel de poliacrilamida, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, bloqueadas com leite 5% diluído em TBS+Tween 0.1% durante 50

minutos em temperatura ambiente, e por fim incubadas *overnight* a 4 °C com anticorpo primário específico para a proteína de interesse. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico e então foi avaliada a intensidade das bandas proteicas após exposição com reagente quimioluminescente. Para a obtenção das imagens, foi utilizado o equipamento G:BOX XR5 Gel imaging system (Syngene®, Cambridge, UK), e posteriormente a intensidade foi quantificada através do *software* UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific Corporation®, Orem, UT).

7.13. Real Time PCR quantitativo (RT-qPCR)

Fragmentos do fígado foram extraídos e homogeneizados em Trizol® (~50 mg em 400 µL). O RNA total foi isolado de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de RNA total foi usada para a síntese de cDNA (2 µg) utilizando o kit *qMAX™ cDNA Synthesis Kits* (Accuris Instruments®, Edison, USA) (16). As amostras de cDNA foram submetidas o protocolo de RT-qPCR com 150-300 ng cDNA e 150-300 nM de primer e *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad®, CA, EUA) no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®, CA, EUA). Os primers utilizados foram sintetizados pela Exxtend® (SP, Brasil) e estão descritos na tabela 2. A quantificação do RNA mensageiro foi obtida pelo método de $\Delta\Delta C_t$.

Tabela de Primers					
Ratos			Camundongos		
<i>Rock1</i>	Reverse	GAATGACATGCAAGCGCAAT	<i>Rock1</i>	Reverse	CAGGTCAACATCTAGCATGGAAC
	Forward	GTCCAAAAGTTTTGCACGCA		Forward	CACGCCTAACTGACAAGCACCA
<i>Rock2</i>	Reverse	GAAACAACCTGGATGAAGCTAATGC	<i>Rock2</i>	Reverse	GTGACCTCAAACAGTCTCAGCAG
	Forward	GTTTCAAGCAGGCAGTTTTTATCTT		Forward	GACAACGCTTCTGAGTTTCCTGC
<i>Nfkb</i>	Reverse	CTTCAATGGCCTCTGTGTAGC	<i>Nfkb</i>	Reverse	GGCAGGCTATTGCTCATCACAG
	Forward	ATGGACAACCTATGAGGTCTCTGG		Forward	GCTGCCAAAGAAGGACACGACA
<i>Tnfa</i>	Reverse	TTGGTGGTTTGCTACGACG	<i>Tnfa</i>	Reverse	GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
	Forward	CCAAATGGGCTCCCTCTCAT		Forward	GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG
<i>Ikf</i>	Reverse	CCAGCTCCTTGGCATATCCT	<i>Ikf</i>	Reverse	ATCTCCTGGCTGTACCTTCTG
	Forward	TGAGTGACATAGCATCGGCT		Forward	GCAGACTGACATTGTGGACCTG
<i>Cd36</i>	Reverse	TGGGTTTTGCACATCAAAGA	<i>Cd36</i>	Reverse	GCAAAGGCATTGGCTGGAAGAAC
	Forward	TGGAGCTGTTATTGGTGCAG		Forward	GGACATTGAGATTCTTTTCCTCTG
<i>Srebp1</i>	Reverse	GGAAGTCACTGTCTTGGTTGTT	<i>Srebp1</i>	Reverse	CCTCCATAGACACATCTGTGCC
	Forward	GACGACGGAGCCATGGATT		Forward	CGACTACATCCGCTTCTTGCAG
<i>Fas</i>	Reverse	GTGAGGTTGCTGTCGTCTGT	<i>Fas</i>	Reverse	CACCAGGTGTAGTGCCTTCCTC
	Forward	GAGGACACTCAAGTGGCTGA		Forward	CACAGTGCTCAAAGGACATGCC
<i>Cpt1a</i>	Reverse	TACCTGCTCACAGTATCTTTGAC	<i>Acc</i>	Reverse	GGAGTCACAGAAGCAGCCCATT
	Forward	GCACCAAGATCTGGATGGCTATGG		Forward	GTTCTGTTGGACAACGCCTTCAC
<i>Ppara</i>	Reverse	GCTGGAGAGAGGGTGTCTGT	<i>Cpt1a</i>	Reverse	CAGTGTCCATCCTCTGAGTAGC
	Forward	TGCGGACTACCAGTACTTAGGG		Forward	GGCATAAACGCAGAGCATTCTCTG
<i>G6pase</i>	Reverse	CGTTCAAACACCGGAATCCA	<i>Ppara</i>	Reverse	GAATCTTGCAGCTCCGATCACAC
	Forward	GCGCAGCAGGTGTATACTATG		Forward	ACCACTACGGAGTTCACGCATG
<i>Pepck</i>	Reverse	CTTAAGTTGCCTTGGGCATCA	<i>Pgc1a</i>	Reverse	CATCCCTCTTGAGCCTTTCGTG
	Forward	AGAAGAAATACCTGGCCGCA		Forward	GAATCAAGCCACTACAGACACCG
<i>Pc</i>	Reverse	TCAGCATCATTAGTGTGTCAGC	<i>G6pase</i>	Reverse	GTAGCAGGTAGAATCCAAGCGC
	Forward	AAGTTTGGTTGCGCGGAG		Forward	AGGTCGTGGCTGGAGTCTTGTG
<i>B-actin</i>	Reverse	TCACCCACACTGTGCCCAT	<i>Pepck</i>	Reverse	GGCGATGACATTGCCTGGATGA
	Forward	TCTTTAATGTCACGCACGATT		Forward	TGTCTTCACTGAGGTGCCAGGA
			<i>Pc</i>	Reverse	GCAATCGAAGGCTGCGTACAGT
				Forward	GGATGACCTCACAGCCAAGCAT
			<i>B-actin</i>	Reverse	TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG
				Forward	CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG

Tabela 2. Sequências de primers utilizados.

7.14. Análises histológicas

Durante a extração do tecido hepático, um fragmento foi fixado em paraformoldeído 4% (PFA) durante 24 horas, então desidratado, emblocado em parafina e cortado (10 µm) em micrótomo (Leica®, RM2145) e aderidos em lâminas histológicas. Estas lâminas foram hidratadas e coradas com hematoxilina-eosina (H&E), Tricromio de Masson ou Picrosírius Red e analisadas posteriormente. As imagens foram adquiridas em microscópio óptico (LAB2000, LABORANA®, São Paulo, Brazil) com a câmera Moticam Pro 282B 5.0 megapixels (Motic®, Hong Kong, China) nos aumentos de 10X e 40X.

Outro fragmento do tecido hepático foi congelado gradativamente com isopentano e estocado a -80°C. Estes fragmentos foram cortados (10 µm) em criostato (Leica®, CM1850) e

aderidos em lâminas histológicas. Estas lâminas foram coradas com a solução de Oil Red (ORO, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO) por 25 minutos, seguido de 2 minutos de hematoxilina, e lavadas posteriormente por 30 minutos com água destilada. Posteriormente, as imagens foram analisadas e adquiridas como descrito acima.

7.15. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Primeiramente, a normalidade dos resultados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk W-test. Para dados com distribuição normal, foi realizado o teste de One-way ANOVA, seguido do teste de Tukey. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Em comparações entre dois grupos foram utilizados os testes “t de student” ou Mann-Whitney. O valor de significância adotado foi de $p < 0.05$. Para a análise dos dados e edição dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.0®.

8. RESULTADOS:

8.1. Ratos Wistar apresentam maior acúmulo de massa corpórea durante o envelhecimento

Como proposto inicialmente no projeto de pesquisa, foram utilizados ratos da linhagem Wistar e Fischer, com o objetivo de avaliar os efeitos do envelhecimento associado ou não ao aumento da adiposidade corporal. Sendo assim, é possível observar que ratos Wistar apresentam uma maior massa corpórea durante os 17 meses de envelhecimento comparado aos ratos Fischer (Figura 8A-C). Os dados fisiológicos e moleculares encontrados nestes modelos serão apresentados nos próximos tópicos separadamente.

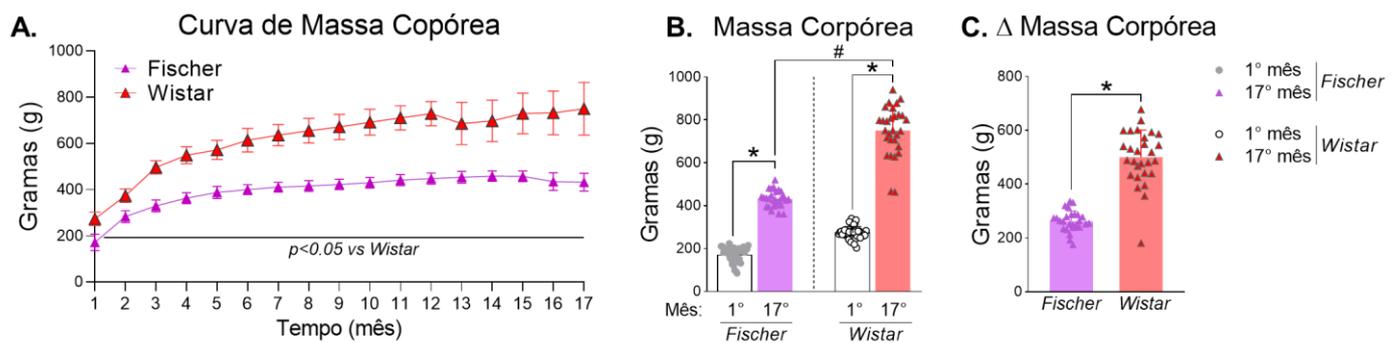


Figura 8. Ratos Wistar apresentam massa corpórea exacerbada durante o envelhecimento comparados aos ratos Fischer.

A. Curva da massa corpórea em ratos Wistar e Fischer durante 17 meses. B. Massa corpórea no 1º e 17º mês em ratos Wistar e Fischer. C. Delta da massa corpórea entre o 1º e 17º mês. Dados representados como a média e desvio padrão (n=40 no 1º mês e n=27 no 17º mês). * $p < 0.05$ vs 1º mês. # $p < 0.05$ vs 17º mês.

8.2. Exercício físico atenua os prejuízos metabólicos e o aumento do conteúdo da proteína ROCK no fígado de ratos Fischer idosos

Como mencionado anteriormente, os resultados em modelos experimentais foram apresentados em tópicos separados. Nos experimentos envolvendo ratos Fischer, foi observado um efeito do envelhecimento em aumentar a massa corpórea, a insulinemia de jejum e o índice HOMA-IR, sem alterações sobre a glicemia de jejum (Figura 9A-C). O exercício físico aeróbio, por outro lado, foi eficiente em diminuir a glicemia de jejum, insulinemia de jejum e o índice HOMA-IR em ratos Fischer idosos, de maneira independente de alterações na massa corpórea (Figure 9A-C). Em relação à tolerância à glicose, o grupo de ratos Fischer idosos apresentou maior intolerância comparado com o grupo jovem, sendo que o exercício físico aeróbio foi eficiente em melhorar a sensibilidade à glicose comparado com o grupo idoso sedentário (Figura 9E). Os ratos idosos sedentários não apresentaram intolerância à insulina comparado aos ratos jovens, no entanto, o

exercício físico aeróbio apresentou diferença significativa para o grupo idoso (Figura 9F). Estas modulações metabólicas foram acompanhadas de uma piora na sensibilidade à insulina hepática no grupo idoso sedentário comparado aos ratos jovens ($pIRS1^{Y612}$ e $pAkt^{S473}$), sendo que o exercício físico aeróbio reestabeleceu este quadro, melhorando a sensibilidade à insulina hepática (Figura 9G).

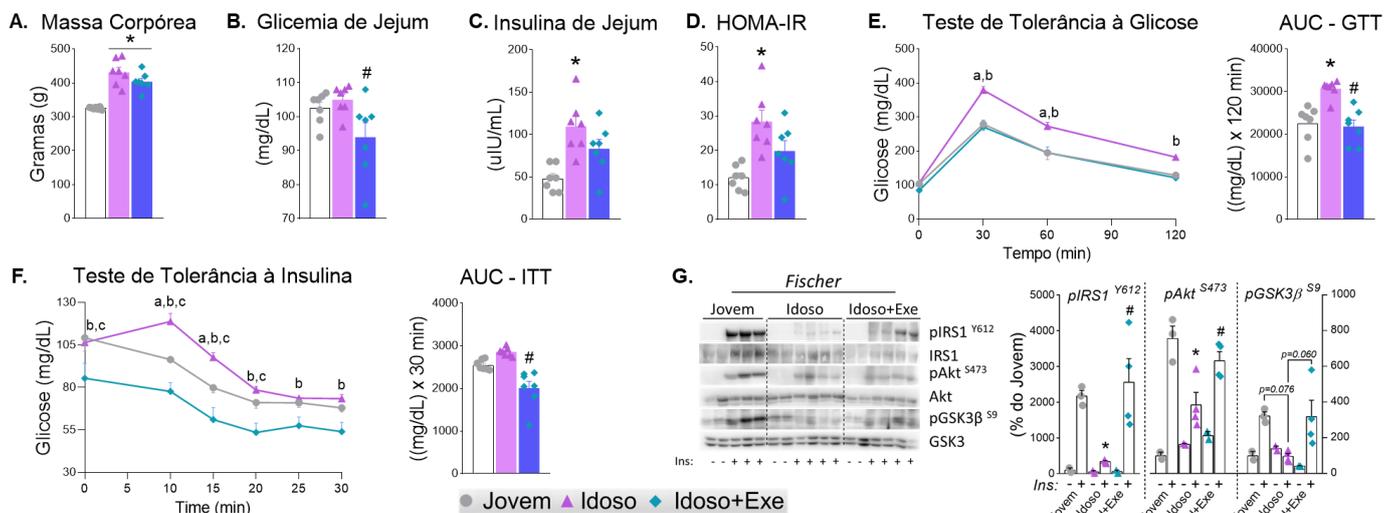


Figura 9. Exercício físico aeróbio melhora o quadro de hiperinsulinemia, intolerância à glicose e de piora na sinalização da insulina no fígado de ratos Fischer idosos.

A. Massa corpórea. B. Glicemia de jejum. C. Insulinemia de Jejum. D. Índice HOMA-IR. E. Curva do teste de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva (AUC) do GTT. F. Curva do teste de tolerância à insulina (ITT) e área sob a curva (AUC) do ITT. G. Proteínas da via de sinalização da insulina no tecido hepático ($pIRS1^{Y612}$ / $pAkt^{S473}$ / $pGSK3\beta^{S9}$) em resposta ou não à insulina (n= 3, 4 e 4 para amostras positivas). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-F (n= 7). * $p < 0.05$ vs Jovem. # $p < 0.05$ vs Idoso. a $p < 0.05$ Jovem vs Idoso. b $p < 0.05$ Idoso vs Idoso+Exe. c $p < 0.05$ Jovem vs Idoso+Exe.

Em relação aos parâmetros metabólicos relacionados com o metabolismo hepático, foi observado uma tendência ($p=0.06$) ao acúmulo de triglicerídeos (TG) hepáticos no grupo idoso sedentário e um efeito positivo do exercício físico aeróbio em diminuir o TG e colesterol hepático no grupo idoso exercitado em comparação com o grupo idoso sedentário (Figura 10A-B). Em relação aos parâmetros séricos, foi observado aumento de TG e colesterol no soro do grupo idoso em relação ao grupo jovem, sem alteração nos níveis de ALT e AST (Figura 10C-D). No entanto, o exercício físico aeróbio diminuiu o TG e colesterol circulante, bem como os níveis de ALT e AST no grupo idoso exercitado comparado ao grupo idoso sedentário (Figura 10C-D). Também foi observado o aumento de marcadores inflamatórios (*Nfkb* e *Tnfa*) no fígado do grupo idoso sedentário, sendo estes revertidos pelo exercício físico (Figura 10E). Ao mesmo tempo, foi

observado aumento no gene da *Rock1*, aumento no conteúdo proteico de ROCK1 e ROCK2, tendência ao aumento da atividade da ROCK (pMYPT1, $p=0.07$), aumento de SREBP1c e FAS no fígado do grupo idoso comparado ao grupo jovem (Figura 10F-G). Já o grupo idoso exercitado demonstrou diminuição significativa dos genes da *Rock1* e *Rock2* e do conteúdo proteico de ROCK2 e FAS no tecido hepático, comparado ao grupo idoso sedentário (Figura 10F-G). Também foi observado o aumento de marcadores lipogênicos (*Cd36* e *Fas*) e gliconeogênicos (*G6pase*, *Pepck* e *Pc*) no fígado do grupo idoso sedentário comparado ao grupo jovem, bem como um positivo efeito do exercício físico aeróbio em diminuir *Fas*, *G6pase*, *Pepck* e *Pc* e aumentar genes de oxidação de gorduras (*Cpt1 α* e *Ppara*) comparado ao grupo idoso sedentário.

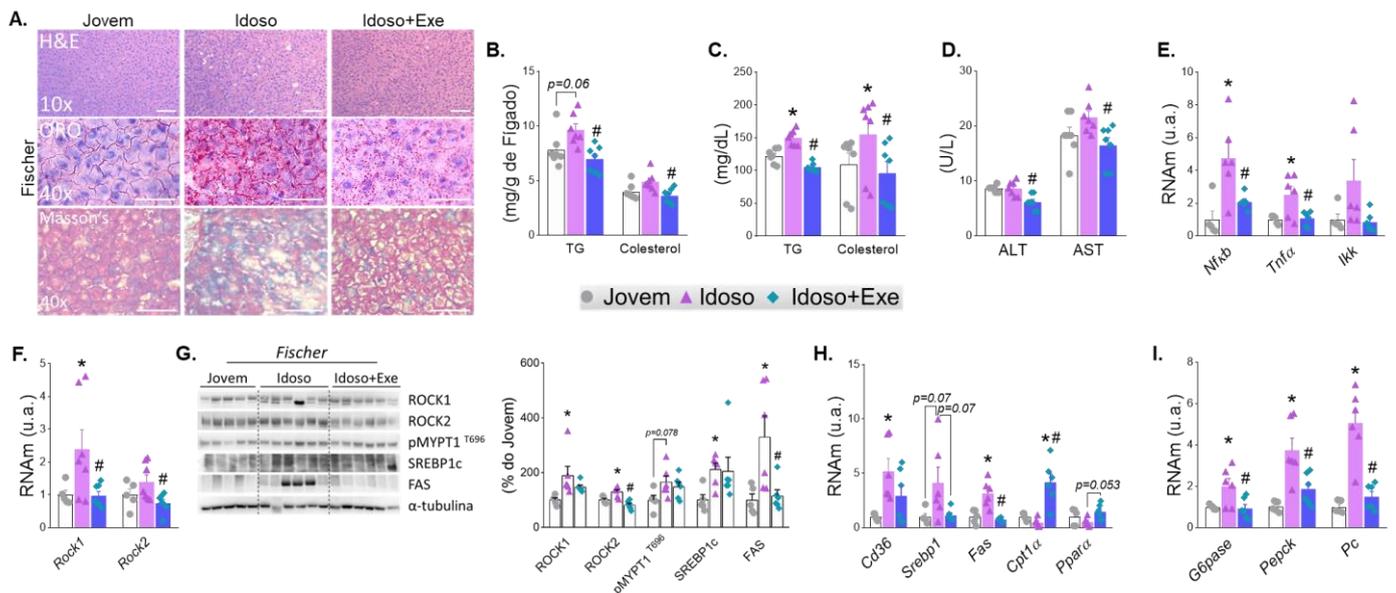


Figura 10. Exercício físico aeróbio contribui com a melhora do acúmulo de gordura hepática, inflamação, conteúdo de ROCK, lipogênese e gliconeogênese hepática em ratos Fischer idosos.

A. Imagens representativas das colorações com Hematoxilina-Eosina (H&E), Oil Red O (ORO) e Tricrômio de Masson. B. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol hepáticos. C. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol séricos. D. Níveis das enzimas ALT e AST no soro. E. Genes inflamatórios (*Nfkb*, *Tnfa* e *Ikk*). F. RNAm de *Rock1* e *Rock2*. G. Conteúdo proteico de ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}, SREBP1c e FAS. H. Marcadores lipogênicos (*Cd36*, *Srebp1* e *Fas*) e de oxidação de gorduras (*Cpt1 α* e *Ppara α*). I. Marcadores gliconeogênicos (*G6pase*, *Pepck* e *Pc*). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos B-D (n= 7), E, F, H-I (n= 6), G (n= 5, 6, 6). * p < 0.05 vs Jovem. # p < 0.05 vs Idoso. Na figura A as barras representam 100 μ M (10X) e 50 μ M (40X).

8.3. Exercício físico aeróbio atenua os prejuízos metabólicos e o aumento do conteúdo da proteína ROCK no fígado de ratos Wistar idosos

Quando investigado os efeitos do envelhecimento sobre ratos Wistar, foi observado aumento da massa corpórea, da insulinemia de jejum e o índice HOMA-IR, sem alterações sobre a glicemia de jejum no grupo idoso sedentário comparado ao grupo jovem (Figura 11A-C). O grupo idoso exercitado demonstrou melhora na insulinemia de jejum e no índice HOMA-IR comparado ao grupo idoso sedentário, independente de alterações na massa corpórea e na glicemia de jejum (Figure 11A-C). Em relação a sensibilidade à glicose e insulina, o grupo idoso sedentário apresentou intolerância à glicose e à insulina comparado com o grupo jovem, sendo que o exercício físico melhorou estes parâmetros comparado com o grupo idoso sedentário (Figura 11E-F). Isto foi aeróbio acompanhado de alterações na sensibilidade à insulina hepática no grupo idoso sedentário comparado aos ratos jovens (pGSK3 β ^{S9}), sendo que o exercício físico aeróbio reestabeleceu (pAkt^{S473}/pGSK3 β ^{S9}) este quadro, melhorando a sinalização da insulina hepática (Figura 11G).

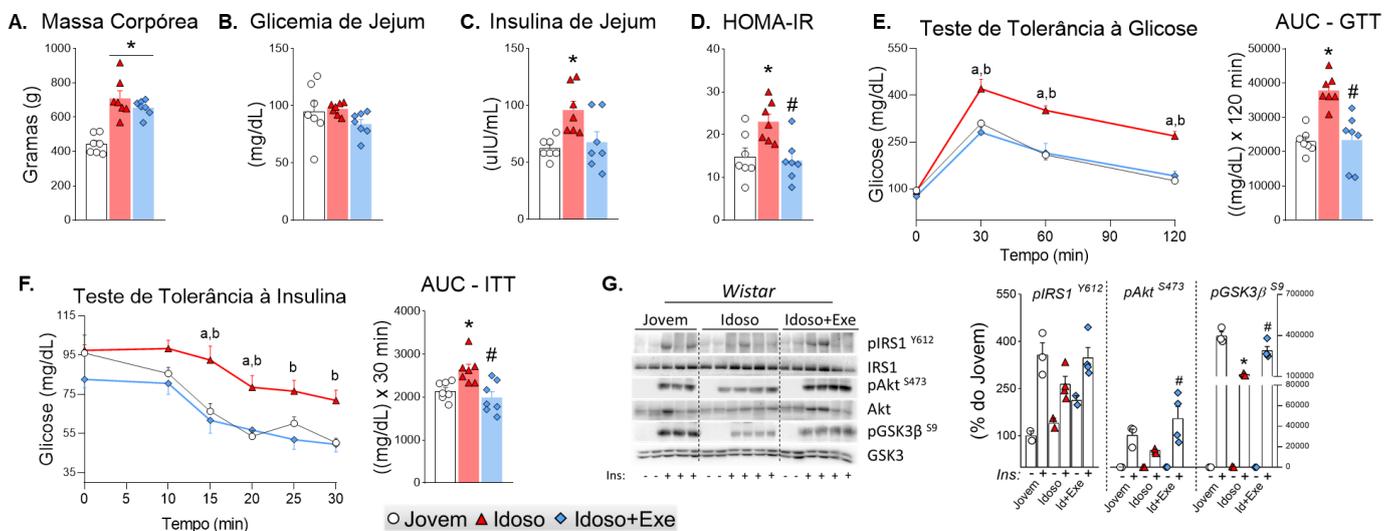


Figura 11. Exercício físico aeróbio melhora o quadro de hiperinsulinemia, intolerância à glicose, resistência à insulina, e de piora na sinalização da insulina no fígado de ratos Wistar idosos.

A. Massa corpórea. B. Glicemia de jejum. C. Insulinemia de Jejum. D. Índice HOMA-IR. E. Curva do teste de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva (AUC) do GTT. F. Curva do teste de tolerância à insulina (ITT) e área sob a curva (AUC) do ITT. G. Proteínas da via de sinalização da insulina no tecido hepático (pIRS1^{Y612}/pAkt^{S473}/pGSK3 β ^{S9}) em resposta ou não à insulina (n= 3, 4 e 4 para amostras positivas). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-F (n= 7). * p < 0.05 vs Jovem. # p < 0.05 vs Idoso. a p < 0.05 Jovem vs Idoso. b p < 0.05 Idoso vs Idoso+Exe.

No metabolismo hepático, foi observado aumento de TG e uma tendência ($p=0.06$) ao aumento de colesterol no fígado do grupo idoso sedentário comparado ao grupo jovem, sendo que o exercício físico aeróbio protegeu sobre estas alterações (Figura 12A-B). No soro, foi observado aumento de TG, colesterol e ALT no grupo idoso em relação ao grupo jovem, sem alteração nos níveis de AST (Figura 12C-D). Além disso, o exercício físico aeróbio reverteu todos estes aumentos encontrados no soro do grupo idoso (Figura 12C-D). Este modelo experimental idoso, apresentou um importante aumento em marcadores inflamatórios (*Nfkb*, *Tnfa* e *Ikk*) no fígado comparado ao grupo jovem, os quais foram revertidos no grupo idoso exercitado (Figura 12E). Também foi observado aumento no gene da *Rock1*, aumento no conteúdo proteico de ROCK1, ROCK2, pMYPT1, SREBP1c e FAS no fígado do grupo idoso comparado ao grupo jovem (Figura 12F-G). O grupo de ratos Wistar idosos exercitados, por outro lado, apresentou diminuição significativa de todos estes marcadores relacionados com a atividade da ROCK e com a lipogênese hepática comparado ao grupo idoso sedentário (Figura 12F-G). Isto foi acompanhado com o aumento de marcadores lipogênicos (*Cd36* e *Fas*) e gliconeogênicos (*G6pase*, *Pepck* e *Pc*) no fígado do grupo idoso sedentário comparado ao grupo jovem, bem como acompanhado de um efeito do exercício físico aeróbio em diminuir *Cd36*, *Fas*, *G6pase*, *Pepck* e *Pc* e aumentar *Cpt1 α* (oxidação) comparado ao grupo idoso sedentário.

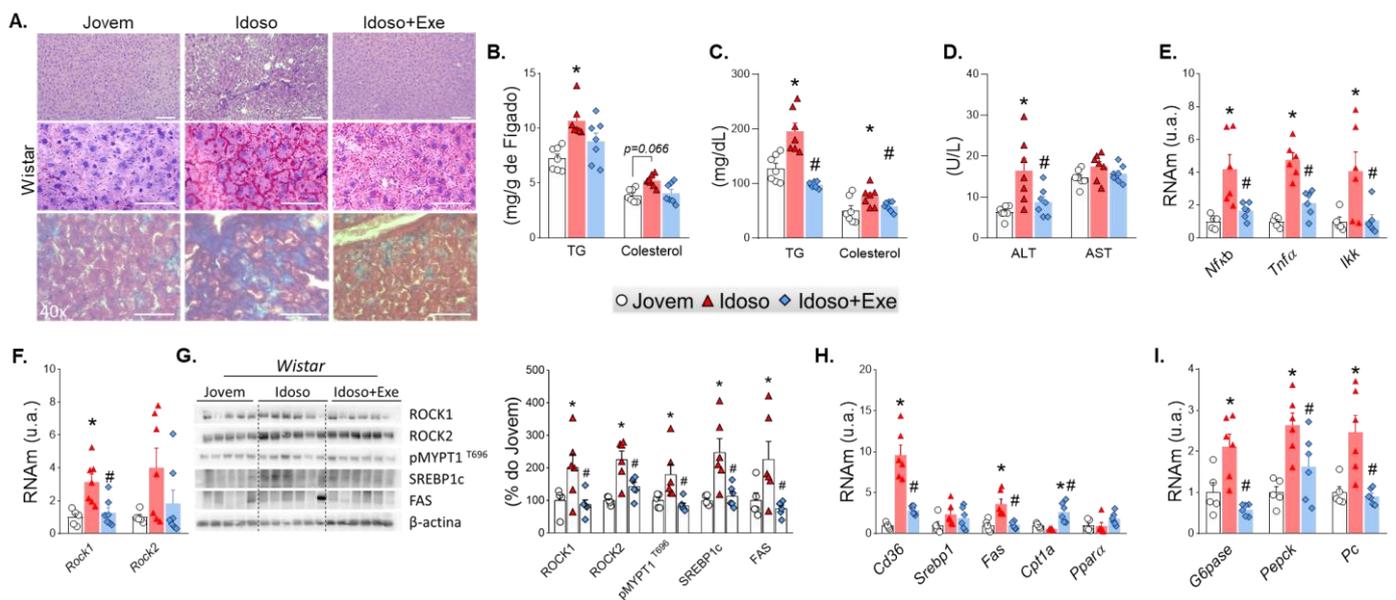


Figura 12. Exercício físico aeróbio contribui com a melhora do acúmulo de gordura hepática, inflamação, conteúdo de ROCK, lipogênese e gliconeogênese hepática em ratos Wistar idosos.

A. Imagens representativas das colorações com Hematoxilina-Eosina (H&E), Oil Red O (ORO) e Tricrômio de Masson. B. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol hepáticos. C. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol séricos. D. Níveis das enzimas ALT e AST no soro. E. Genes inflamatórios (*Nfkb*, *Tnfa* e *Ikk*). F. RNAm de *Rock1* e *Rock2*. G. Conteúdo proteico de ROCK1,

ROCK2, pMYPT1^{T696}, SREBP1c e FAS. H. Marcadores lipogênicos (*Cd36*, *Srebp1* e *Fas*) e de oxidação de gorduras (*Cpt1a* e *Ppara*). I. Marcadores gliconeogênicos (*G6pase*, *Pepck* e *Pc*). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos B-D (n= 7), E, F, H-I (n= 6), G (n= 5, 6, 6). * p < 0.05 vs Jovem. # p < 0.05 vs Idoso. Na figura A as barras representam 100 μ M (10X) e 50 μ M (40X).

8.4. Exercício físico aeróbio melhora o metabolismo hepático e diminui a atividade da ROCK no fígado de camundongos C57BL/6J idosos

Os efeitos do envelhecimento sobre a proteína ROCK e o metabolismo hepático também foram observados em camundongos C57BL/6J. Como observado nos dois modelos de ratos idosos (Wistar e Fischer), o envelhecimento aumentou a massa corpórea de camundongos C57BL/6J e o treinamento de curta duração não alterou este parâmetro (Figura 13A). Estes camundongos idosos sedentários apresentaram intolerância à glicose e à insulina comparado ao grupo de camundongos jovens, acompanhado de uma piora na sensibilidade à insulina hepática (pIRS1^{Y612}/pAkt^{S473}) (Figura 13C-E). Em contraste, o grupo idoso exercitado melhorou a sensibilidade à glicose e à insulina e aumentou a pAkt^{S473} e pGSK3 β ^{S9} hepática, bem como protegeu da diminuição na fosforilação do pIRS1^{Y612} comparado ao grupo idoso sedentário (Figura 13C-E).

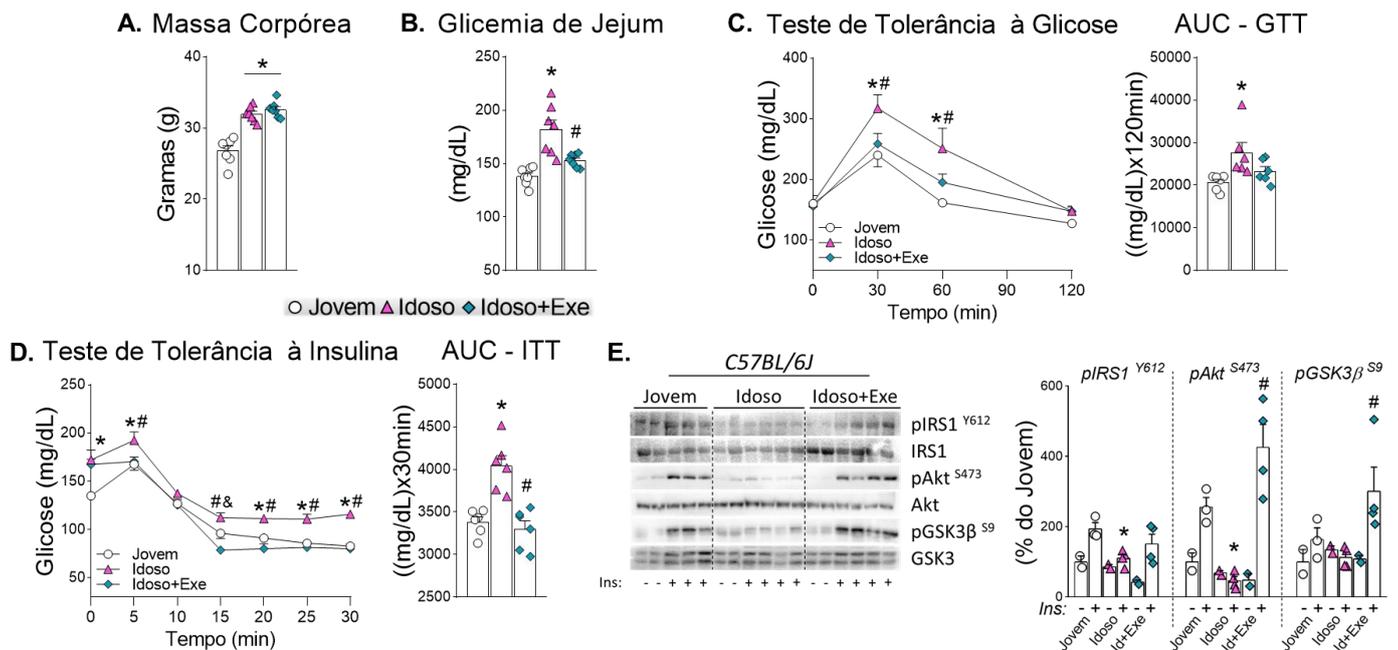


Figura 13. Exercício físico aeróbio melhora o quadro de intolerância à glicose, resistência à insulina, e de piora na sinalização da insulina no fígado de camundongos C57BL/6J idosos.

A. Massa corpórea. B. Glicemia de jejum. C. Curva do teste de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva (AUC) do GTT. D. Curva do teste de tolerância à insulina (ITT) e área sob a curva (AUC) do ITT. E. Proteínas da via de sinalização da insulina no tecido hepático

(pIRS1^{Y612}/pAkt^{S473}/pGSK3 β ^{S9}) em resposta ou não à insulina (n= 3, 4 e 4 para amostras positivas). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-D (n= 6). * p < 0.05 vs Jovem. # p < 0.05 vs Idoso.

Quando observado o metabolismo hepático de camundongos C57BL/6J idosos, foi observado aumento do conteúdo de TG e colesterol no fígado, tendência ao aumento de TG no soro, aumento de colesterol sérico e aumento da enzima ALT no soro comparado ao grupo jovem (Figura 14A-D). De maneira importante, o exercício físico aeróbio foi eficiente em reverter ou proteger diante destes parâmetros. Em relação à inflamação hepática, observou-se aumento nos genes *Tnfa*, *Ikk*, *Nfkb*, *I11 β* e *Ptp1b* no grupo idoso comparado ao grupo jovem, sendo que o exercício reverteu o aumento destes genes (Figura 14E). Também foi encontrado aumento no RNAm de *Rock1* e *Rock2* e no conteúdo de ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}, SREBP1c e FAS no tecido hepático com o envelhecimento, e um efeito positivo do exercício físico aeróbio em atenuar estes marcadores (Figura 14F-G). Acompanhando as alterações nas proteínas de lipogênese (SREBP1c e FAS) no fígado, também foi observado aumento no RNAm de marcadores lipogênicos (*Cd36*, *Srebp1*, *Acc*) com o envelhecimento e diminuição destes genes em resposta ao exercício físico aeróbio (Figure 14H). Além disso, foi observado aumento do RNAm de *Cpt1 α* e *Ppara* em resposta ao exercício físico aeróbio, sugerindo maior oxidação de gorduras no fígado destes camundongos (Figure 14H). Em relação aos marcadores de gliconeogênese no fígado, o grupo idoso sedentário apresentou aumento no RNAm de *Pgc1 α* , *G6pase*, *Pepck* e *Pc* comparado ao grupo jovem, sendo o exercício físico aeróbio eficiente na atenuação destes marcadores comparado ao grupo idoso sedentário (Figure 14I).

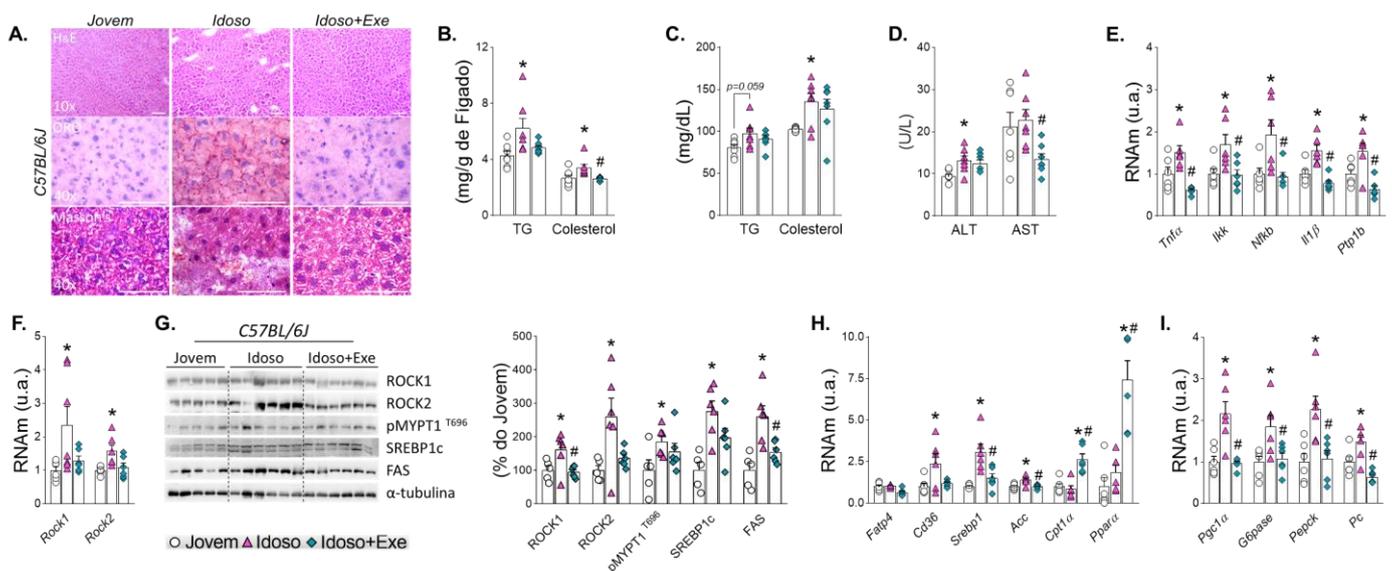


Figura 14. Exercício físico aeróbio contribui com a melhora do acúmulo de gordura hepática, inflamação, conteúdo de ROCK, lipogênese e gliconeogênese hepática em camundongos C57BL/6J idosos.

A. Imagens representativas das colorações com Hematoxilina-Eosina (H&E), Oil Red O (ORO) e Tricrômio de Masson. B. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol hepáticos. C. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol séricos. D. Níveis das enzimas ALT e AST no soro. E. Genes inflamatórios (*Tnfa*, *Ikk*, *Nfkb*, *Il1 β* e *Ptp1b*). F. RNAm de *Rock1* e *Rock2*. G. Conteúdo proteico de ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}, SREBP1c e FAS. H. Marcadores lipogênicos (*Fatp4*, *Cd36*, *Srebp1*, *Acc*) e de oxidação de gorduras (*Cpt1a* e *Ppara*). I. Marcadores gliconeogênicos (*Pgc1a*, *G6pase*, *Pepck* e *Pc*). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-E, H-I (n= 6), F (n= 5, 6, 5). * p < 0.05 vs Jovem. # p < 0.05 vs Idoso.

8.5. Inibição farmacológica da ROCK melhora o metabolismo hepático e diminui a atividade da ROCK no fígado de camundongos C57BL/6J idosos

Após observar os efeitos positivos do exercício físico aeróbio sobre o metabolismo hepático e sobre a regulação da atividade da proteína ROCK no fígado de camundongos idosos, o próximo passo foi investigar os efeitos de uma inibição farmacológica da proteína ROCK nestes mesmos parâmetros em camundongos C57BL/6J idosos. Primeiramente, foi observado uma diminuição da glicemia de jejum, melhora da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina nos camundongos idosos quando tratados com o inibidor farmacológico da ROCK (Y-27632, 30 mg/Kg I.P. durante 7 dias) (Figura 15B-D). Essas melhoras foram associadas com a potencialização da sensibilidade à insulina hepática comparado aos camundongos controles (pIRS1^{Y612}/pAkt^{S473}/pGSK3 β ^{S9}) (Figura 15E).

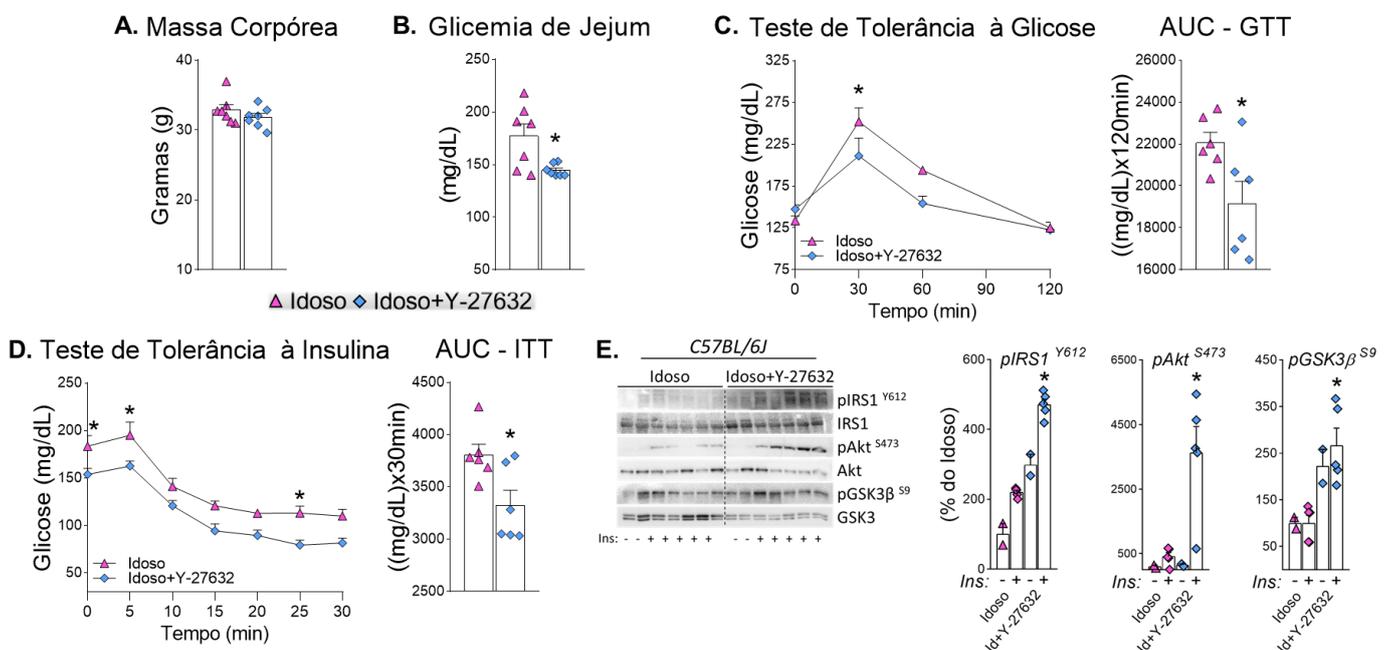


Figura 15. Inibição farmacológica da ROCK melhora o quadro de intolerância à glicose, resistência à insulina, e de piora na sinalização da insulina no fígado de camundongos C57BL/6J idosos.

A. Massa corpórea. B. Glicemia de jejum. C. Curva do teste de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva (AUC) do GTT. D. Curva do teste de tolerância à insulina (ITT) e área sob a curva (AUC) do ITT. E. Proteínas da via de sinalização da insulina no tecido hepático (pIRS1^{Y612}/pAkt^{S473}/pGSK3 β ^{S9}) em resposta ou não à insulina (n= 5 para amostras positivas). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-D (n= 6). * p < 0.05 vs Idoso.

Em relação aos parâmetros hepáticos, foi observado diminuição no conteúdo de TG e colesterol hepáticos nos camundongos idosos tratados com o inibidor da ROCK, sem alterações nos níveis de TG e Colesterol séricos (Figura 16A-B). Também foi observado diminuição nos níveis da enzima ALT circulante e de marcadores inflamatórios (*Tnfa*, *Ikk*, *Nfkb*, *Il1 β* e *Ptp1b*) no tecido hepático dos camundongos do grupo idoso+Y-27632 (Figura 16C-D). O efeito da inibição da ROCK foi confirmado por uma diminuição em seu conteúdo proteico e atividade (ROCK1, ROCK2 e pMYPT^{T696}), acompanhado de diminuição no conteúdo de SREBP1c e FAS e do RNAm de *Fatp4*, *Cd36*, *Srebp1*, *Fas* e *Acc* no fígado de camundongos idosos (Figura 16F-G). A inibição da ROCK, ao mesmo tempo, foi eficiente em aumentar marcadores de oxidação de gorduras (*Cpt1 α* e *Ppara*) e atenuar marcadores gliconeogênicos (*Pgc1 α* , *G6pase*, *Pepck* e *Pc*) no tecido hepático.

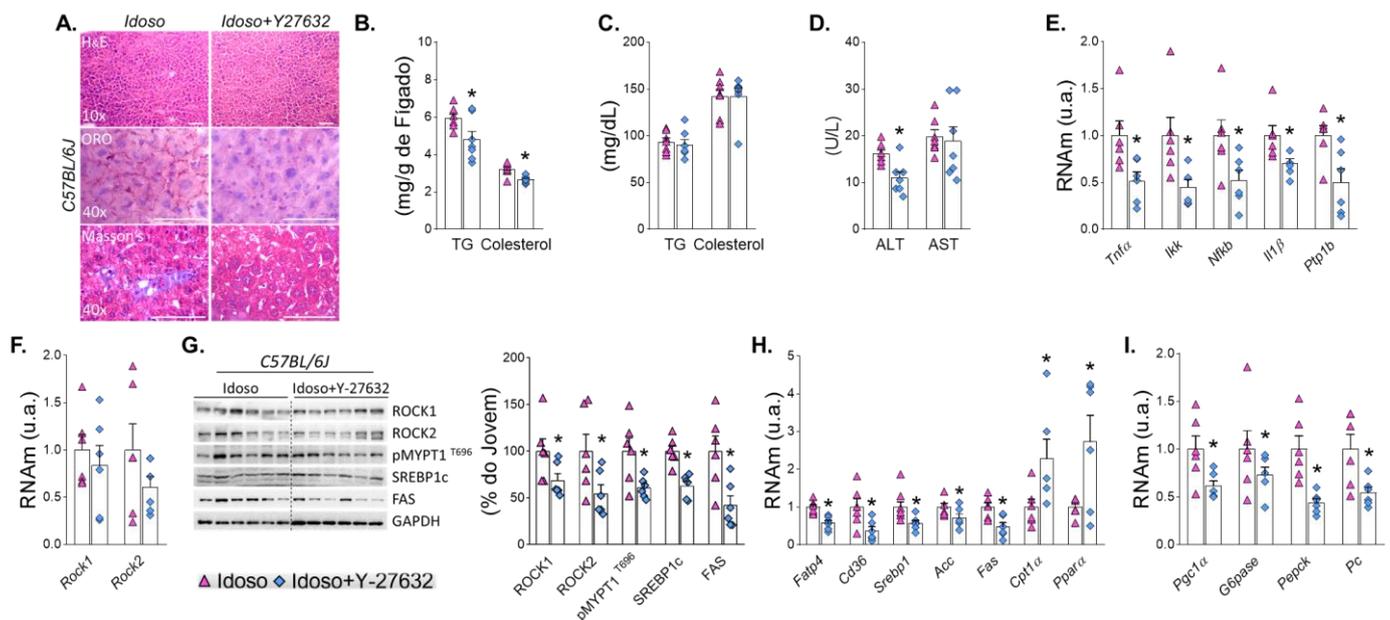


Figura 16. Inibição farmacológica da ROCK atenua o acúmulo de gordura hepática, inflamação, conteúdo de ROCK, lipogênese e gliconeogênese hepática em camundongos C57BL/6J idosos.

A. Imagens representativas das colorações com Hematoxilina-Eosina (H&E), Oil Red O (ORO) e Tricrômio de Masson. B. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol hepáticos. C. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol séricos. D. Níveis das enzimas ALT e AST no soro. E. Genes inflamatórios (*Tnfa*, *Ikk*, *Nfkb*, *Il1 β* e *Ptp1b*). F. RNAm de *Rock1* e *Rock2*. G. Conteúdo proteico de

ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}, SREBP1c e FAS. H. Marcadores lipogênicos (*Fatp4*, *Cd36*, *Srebp1*, *Acc* e *Fas*) e de oxidação de gorduras (*Cpt1a* e *Ppara*). I. Marcadores gliconeogênicos (*Pgc1a*, *G6pase*, *Pepck* e *Pc*). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-H (n= 6). * p < 0.05 vs Idoso.

Com o intuito de confirmar os dados obtidos em camundongos idosos, foi feita a inibição farmacológica da ROCK em células HepG2 após o estímulo de insulina. Nesse sentido, foi demonstrado uma diminuição da atividade da ROCK (pMYPT1^{T696}) em resposta a insulina, ao Y-27632, e a essas duas intervenções combinadas (Figura 17). O estímulo de insulina foi observado através da pAkt^{S473} e da pGSK3β^{S9}, as quais foram potencializadas com a presença do inibidor da ROCK (Figura 17).

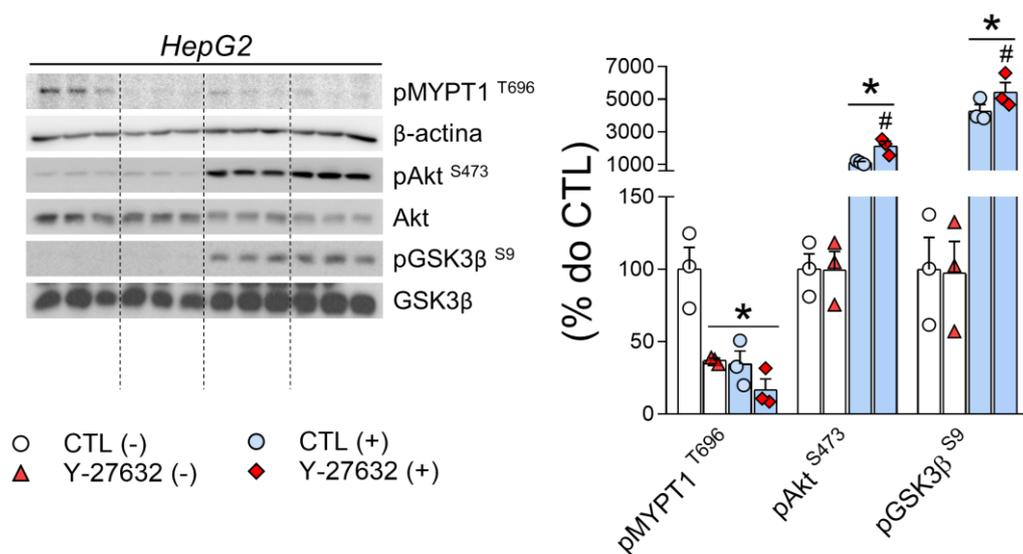


Figura 17. Inibição da ROCK em células HepG2 potencializa a fosforilação da Akt e GSK3β e diminui o conteúdo de PEPCK e G6Pase.

Células HepG2 tratadas com o inibidor farmacológico da ROCK (Y-27632, 10 μM) durante 4 horas e com insulina (20 nM por 15 minutos). Proteínas avaliadas: pMYPT1^{T696}, pAkt^{S473} e pGSK3β^{S9}. Dados representados como a média e erro padrão da média (n=3/grupo). * p < 0.05 vs CTL (-). # p < 0.05 vs CTL (+).

8.6. Camundongos *Slc2a4*^{+/-} apresentam hiperinsulinemia, piores metabólicas e hepáticas, bem como aumento da atividade da ROCK no fígado

Após observar os efeitos do envelhecimento sobre a atividade da proteína ROCK hepática, ficou evidente a presença de hiperinsulinemia em ratos Wistar e Fischer idosos, independente de alterações na glicemia de jejum. Além disso, cada vez mais estudos têm demonstrado os efeitos negativos da hiperinsulinemia sobre a sensibilidade à insulina e sobre o metabolismo hepático. Sendo assim, nós optamos por utilizar a linhagem de camundongos heterozigotos (*Slc2a4^{+/-}*) para o gene do transportador de glicose (GLUT4), que apresentam fenótipo de hiperglicemia e hiperinsulinemia, mesmo sem intervenções dietéticas ou com o envelhecimento. Nesse sentido, foi observado aumento da glicemia de jejum, da insulinemia de jejum, do HOMA-IR, da tolerância à glicose e à insulina e diminuição da pAkt^{S473} hepática no grupo *Slc2a4^{+/-}* comparado ao grupo *WT*, independente de alterações na massa corpórea (Figura 18A-G). Por outro lado, quando estes camundongos *Slc2a4^{+/-}* foram exercitados, houve uma melhora da glicemia de jejum, da insulinemia de jejum, do índice HOMA-IR, da sensibilidade à glicose e à insulina, e da sensibilidade à insulina hepática comparado ao grupo *Slc2a4^{+/-}* sedentário (Figura 18A-G).

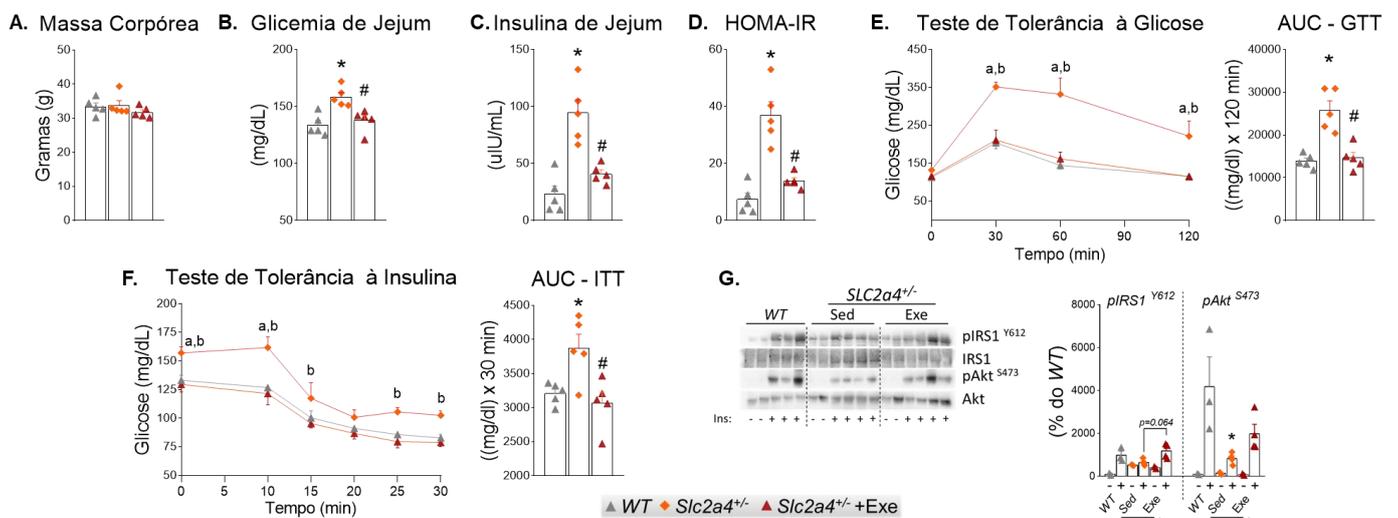


Figura 18. Hiperglicemia e hiperinsulinemia presente em camundongos *Slc2a4^{+/-}* estão associadas com intolerância à glicose e à insulina e com a diminuição na fosforilação da Akt no fígado.

A. Massa corpórea. B. Glicemia de jejum. C. Insulinemia de jejum. D. Índice HOMA-IR. E. Curva do teste de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva (AUC) do GTT. F. Curva do teste de tolerância à insulina (ITT) e área sob a curva (AUC) do ITT. G. Proteínas da via de sinalização da insulina no tecido hepático (pIRS1^{Y612}/pAkt^{S473}) em resposta ou não à insulina (n= 3, 4, 4 para amostras positivas). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-F (n= 5). * p < 0.05 vs *WT*. # p < 0.05 vs *Slc2a4^{+/-}*. a p < 0.05 *WT* vs *Slc2a4^{+/-}*. b p < 0.05 *Slc2a4^{+/-}* vs *Slc2a4^{+/-}*+Exe.

Ao investigar o tecido hepático destes camundongos, o grupo *Slc2a4^{+/-}* sedentário apresentou aumento de TG e tendência (p=0.06) ao aumento de colesterol hepáticos comparado

ao grupo *WT*, independente de alterações nos níveis de TG e colesterol circulantes (Figura 19A-C). Este efeito foi acompanhado do aumento de ALT e AST circulantes, sendo que o exercício físico aeróbio reverteu todos estes parâmetros nos camundongos *Slc2a4^{+/-}* (Figura 19A-D). Em relação aos marcadores moleculares, os camundongos *Slc2a4^{+/-}* sedentários apresentaram aumento no RNAm de *Rock1* e *Fas*, bem como aumento no conteúdo proteico de ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}, SREBP1c e FAS comparado ao grupo *WT* (Figura 19E-G). Quando exercitados, os camundongos *Slc2a4^{+/-}* apresentaram melhoras nestes marcadores, diminuindo o conteúdo de ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}, SREBP1c e FAS comparado ao grupo *Slc2a4^{+/-}* sedentário (Figura 19E-G).

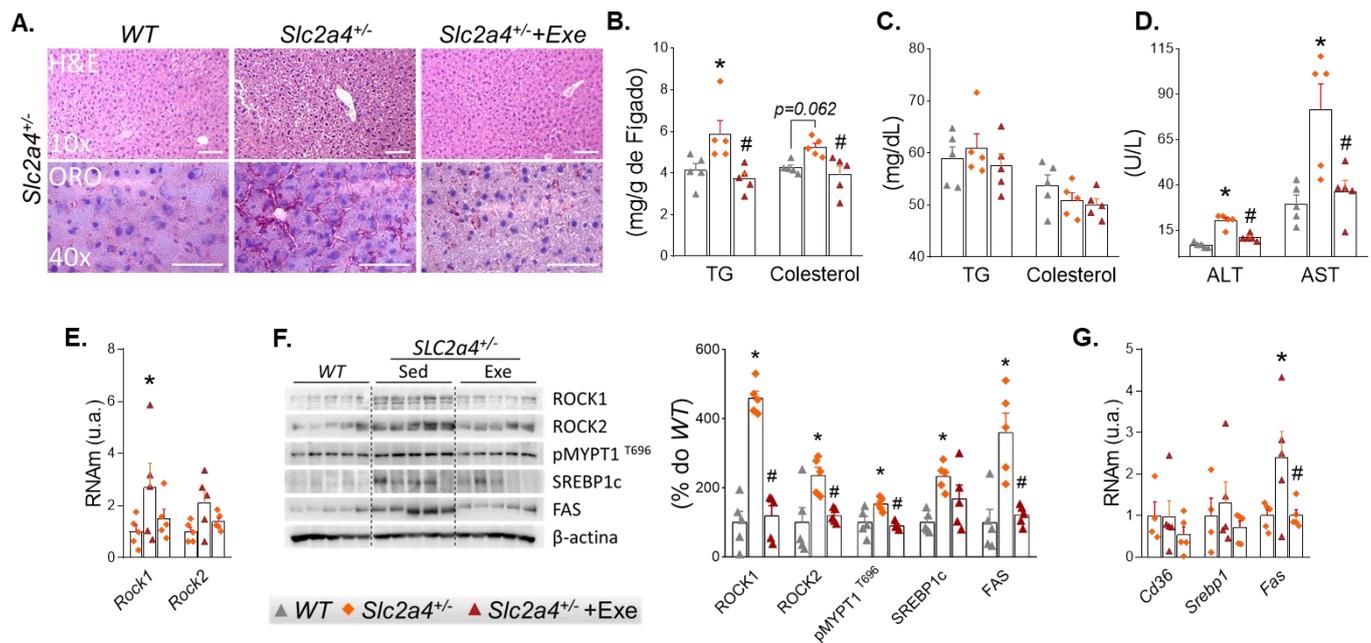


Figura 19. Camundongos *Slc2a4^{+/-}* apresentam acúmulo de gordura hepática e aumento na atividade da ROCK no fígado.

A. Imagens representativas das colorações com Hematoxilina-Eosina (H&E) e Oil Red O (ORO). B. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol hepáticos. C. Níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol séricos. D. Níveis das enzimas ALT e AST no soro. E. RNAm de *Rock1* e *Rock2*. F. Conteúdo proteico de ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}, SREBP1c e FAS. H. Marcadores lipogênicos (*Cd36*, *Srebp1* e *Fas*). Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos B-G (n=5). * $p < 0.05$ vs *WT*. # $p < 0.05$ vs *Slc2a4^{+/-}*. Na figura A as barras representam 100 μ m (10X) e 50 μ m (40X).

Uma vez que foi observado um importante efeito da hiperinsulinemia sobre a via da ROCK e sobre o metabolismo hepático em camundongos *Slc2a4^{+/-}*, foi realizado um experimento adicional em células HepG2. Nesse sentido, estas células foram tratadas com 100 nM de insulina durante 24 horas, seguido de um estímulo de insulina (20 nM por 15 min) para avaliação da sensibilidade

à insulina. Foi encontrado um aumento na $pAkt^{S473}$ em resposta à insulina nas células controle, no entanto, quando essas células foram expostas previamente à insulina por um período prolongado (RI), houve uma piora na $pIRS1^{Y612}/pAkt^{S473}$ e aumento na atividade da ROCK ($pMYPT1^{T696}$). De maneira importante, quando foi realizada a inibição da ROCK (10 μ M de Y-27632 durante 4h) nas células resistentes à insulina, houve uma restauração da sensibilidade à insulina ($pIRS1^{Y612}/pAkt^{S473}$), demonstrando o efeito negativo da proteína ROCK sobre a via de sinalização da insulina em um contexto de hiperinsulinemia (Figura 20).

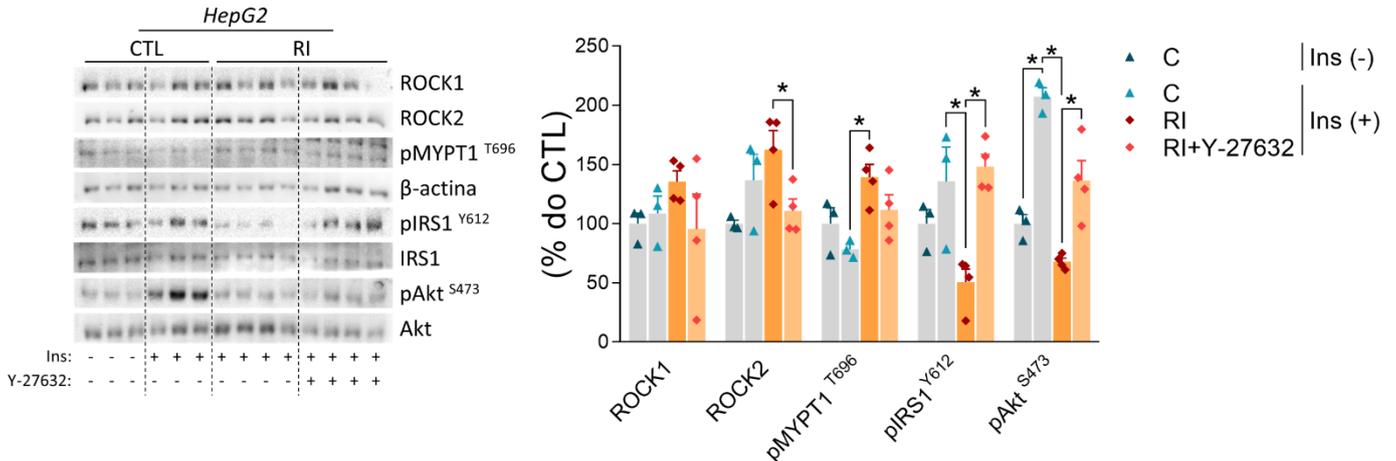


Figura 20. Inibição da ROCK em células HepG2 resistentes à insulina restaura a fosforilação do IRS1 e da Akt.

Proteínas relacionadas com a atividade da ROCK (ROCK1, ROCK2, $pMYPT1^{T696}$) e sinalização da insulina ($pIRS1^{Y612}$ e $pAkt^{S473}$) em células HepG2. Foi realizado o estímulo de insulina (20 nM por 15 min) e com inibidor da ROCK (Y-27632, 10 μ M durante 4 horas) previamente a coleta das células. Dados representados como a média e erro padrão da média (n=3/grupo). * $p < 0.05$ vs o grupo sinalizado.

8.7. Exercício físico aeróbio suprime os efeitos da inflamação de baixo grau induzida por LPS na indução da hiperglicemia, intolerância à glicose, piora na sensibilidade à insulina hepática e aumento na atividade da ROCK no fígado

Com as evidências encontradas neste projeto sobre os efeitos do envelhecimento na atividade da proteína ROCK no tecido hepático, combinado aos dados presentes na literatura que relacionam a proteína ROCK com a inflamação, nós buscamos investigar se em uma condição de inflamação de baixo grau, o exercício físico aeróbio seria possível de regular a atividade da proteína ROCK. Além disso, já é bem caracterizado o papel de uma inflamação de baixo grau recorrente do processo de envelhecimento, a qual está atrelada com a resistência à insulina e aumento da glicemia de jejum. Nesse sentido, foi observado que os camundongos que receberam LPS (1.5 mg/Kg durante 3 semanas) apresentaram aumento da glicemia de jejum e dos níveis de AST

circulantes (Figura 21A-C). Isso foi acompanhado de uma piora na resposta ao estímulo de insulina no tecido hepático (pAKT^{S473}) e piora da sensibilidade à glicose (Figura 21D-E). Em relação à atividade da ROCK no fígado, foi observado aumento no conteúdo de ROCK1 e na pMYPT1^{T696} (Figura 21F). Estes efeitos negativos de uma inflamação e baixo grau foram revertidos quando estes camundongos foram exercitados, apresentando diminuição na glicemia de jejum, aumento na sensibilidade à insulina hepática e na sensibilidade à glicose, bem como diminuindo a atividade da ROCK no fígado (Figura 21A-F).

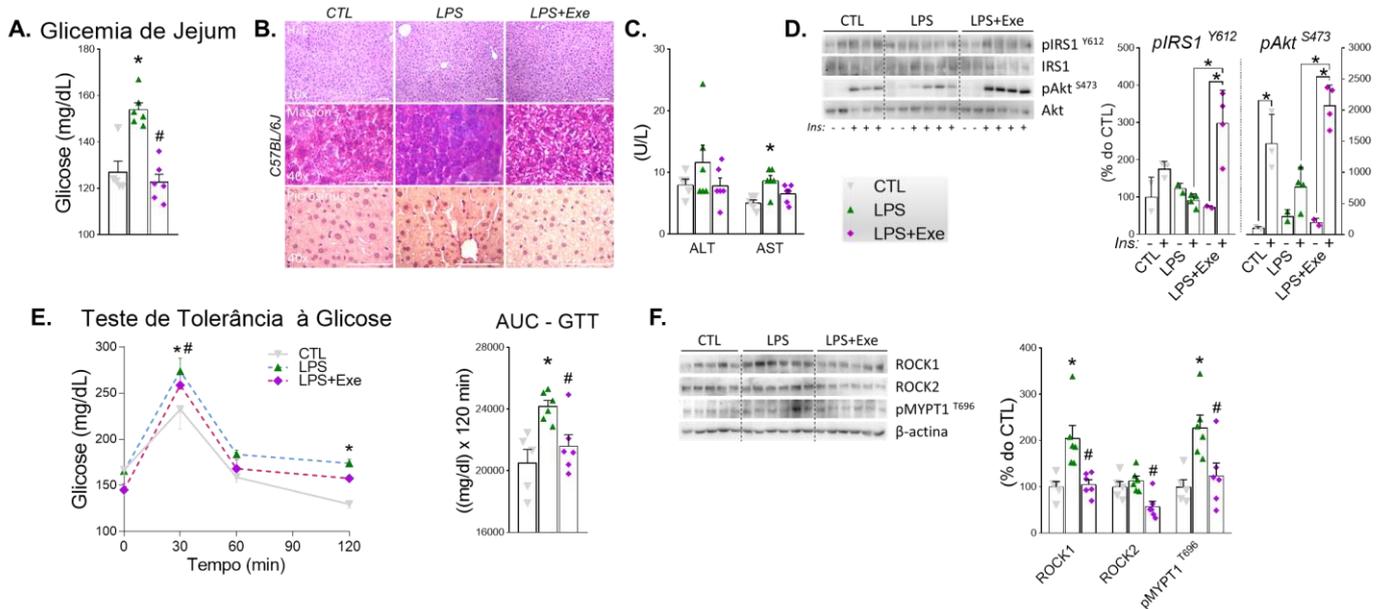


Figura 21. Exercício físico aeróbio inibe os efeitos negativos da inflamação induzida por LPS sobre a intolerância à glicose e atividade da proteína ROCK no fígado.

A. Glicemia de jejum. B. Imagens representativas das colorações com Hematoxilina-Eosina (H&E), Oil Red O (ORO) e Picrosirius Red. C. Níveis de ALT e AST séricos. D. Proteínas relacionadas com a sinalização da insulina (pIRS1^{Y612} e pAkt^{S473}) no tecido hepático (n= 3, 4, 4 para amostras positivas). E. Curva do teste de tolerância à glicose (GTT) e área sob a curva (AUC) do GTT. F. Proteínas relacionadas com a atividade da ROCK (ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}) no tecido hepático. Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A, C, E, F (n= 5, 6, 6). * p < 0.05 vs CTL. # p < 0.05 vs LPS. Na figura B as barras representam 100 μM (10X) e 50 μM (40X).

8.8. Exercício físico aeróbio inibe o aumento da atividade da proteína ROCK no fígado em camundongos com fibrose hepática induzida por CCL₄

Uma vez que estudos apontam para a atividade da ROCK como modulação importante durante o desenvolvimento da fibrose hepática, foi realizada a administração de CCL₄ induzindo esta situação patológica em camundongos. A indução de fibrose foi observada pelo aumento no peso do fígado nos grupos que receberam CCL₄, alterações histológicas no fígado e aumento nos níveis séricos de ALT e AST (Figura 22B-D). Em resposta ao tratamento com CCL₄, houve um aumento no conteúdo de ROCK1 e na pMYPT1^{T696}, no entanto, o exercício físico aeróbio foi eficiente em reduzir estas proteínas no tecido hepático (Figura 22E).

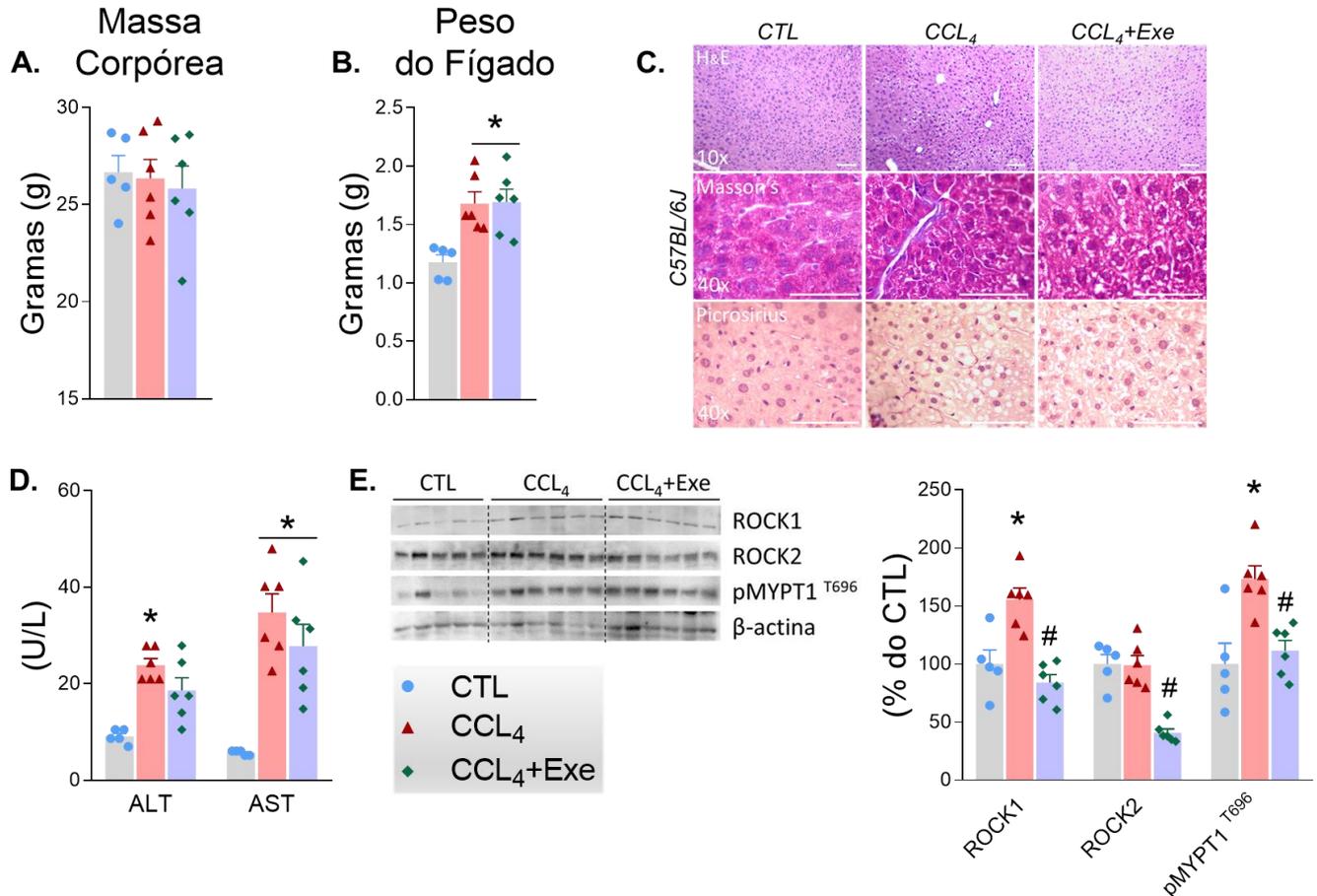


Figura 22. Exercício físico aeróbio reprime os efeitos da fibrose hepática sobre o aumento da atividade da ROCK no fígado.

A. Massa corpórea. B. Peso do fígado. C. Imagens representativas das colorações com Hematoxilina-Eosina (H&E), Oil Red O (ORO) e Picrosírius Red. D. Níveis de ALT e AST séricos. E. Proteínas relacionadas com a atividade da ROCK (ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}) no tecido hepático. Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-D (n= 5, 6, 6). * $p < 0.05$ vs CTL. # $p < 0.05$ vs CCL₄. Na figura C as barras representam 100 μ M (10X) e 50 μ M (40X).

8.9. Exercício físico aeróbio atenua a atividade da ROCK no fígado de camundongos com obesidade genética ou induzida por dieta hiperlipídica

Mesmo que o foco deste projeto de pesquisa seja o envelhecimento, é inegável a estreita relação da obesidade com o descontrole do metabolismo hepático. Além disso, o estilo de vida na atualidade está favorecendo o aumento no número de pessoas obesas em estágios avançados da vida. Nesse sentido, foi observado que tanto a obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DHL), como a obesidade genética (*Ob/Ob*) em camundongos estão associadas com o aumento da atividade da ROCK (pMYPT1^{T696}) no tecido hepático (Figura 23A-B). Em contraste, o exercício físico aeróbio mais uma vez se demonstrou eficiente na regulação em diminuir esta via de sinalização nestas condições associadas a obesidade (Figura 23A-B). Também foi demonstrado que em resposta ao palmitato, células HepG2 aumentam o conteúdo de ROCK1 e ROCK2, associado ao acúmulo de lipídeos intracelulares, demonstrando a resposta dessa proteína nos hepatócitos a um fator nutricional (Figura 23C).

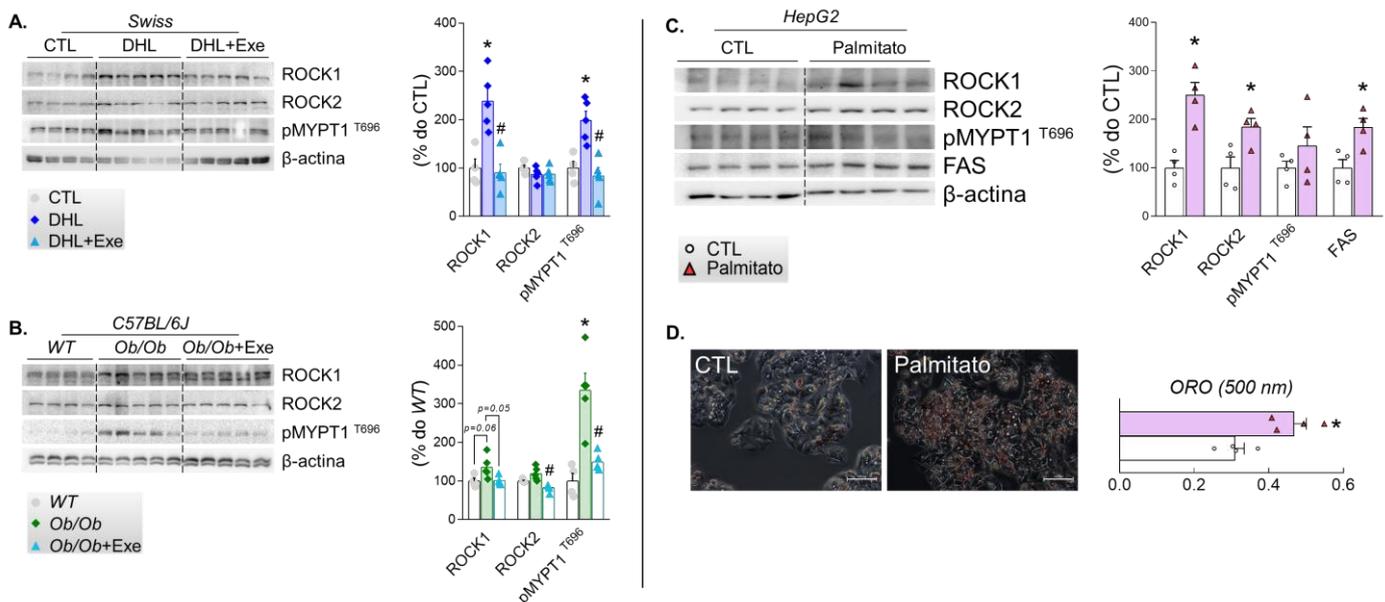


Figura 23. Obesidade genética ou induzida por dieta hiperlipídica aumentam a atividade da ROCK no fígado e o exercício físico aeróbio atenua este efeito.

A. Proteínas relacionadas com a atividade da ROCK (ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}) no tecido hepático de camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. B. Proteínas relacionadas com a atividade da ROCK (ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696}) no tecido hepático de camundongos com obesidade genética. C. Conteúdo de ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696} e FAS em células HepG2 após o tratamento com palmitato (400 μ M por 24 h). D. Imagem representativa e quantificação do acúmulo de lipídeos em células HepG2. Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-B (n= 4, 5, 5), C-D (n= 3). * $p < 0.05$ vs CTL ou WT. # $p < 0.05$ vs DHL ou *Ob/Ob*.

Corroborando os dados da figura anterior, foi feita a transfecção de hepatócitos humanos (Hepa) com o gene da ROCK1 e ROCK2 em resposta ou não a palmitato. Foi encontrado um

aumento de ROCK1 quando feita a superexpressão dessa proteína, acompanhado de aumento da atividade da ROCK (pMYPT1^{T696}) comparado com as células controles (Figura 24A). De maneira interessante, foi observado um aumento no conteúdo de SREBP1c com a superexpressão de ROCK1, na presença ou não de palmitato comparado com as células controles (Figura 24A). Já em relação a transfecção de ROCK2, houve um aumento de ROCK1 e ROCK2 nas células transfectadas e na presença de palmitato comparado aos outros grupos, no entanto, não foram observadas alterações significativas na sua atividade e no conteúdo de SREBP1c (Figura 24B).

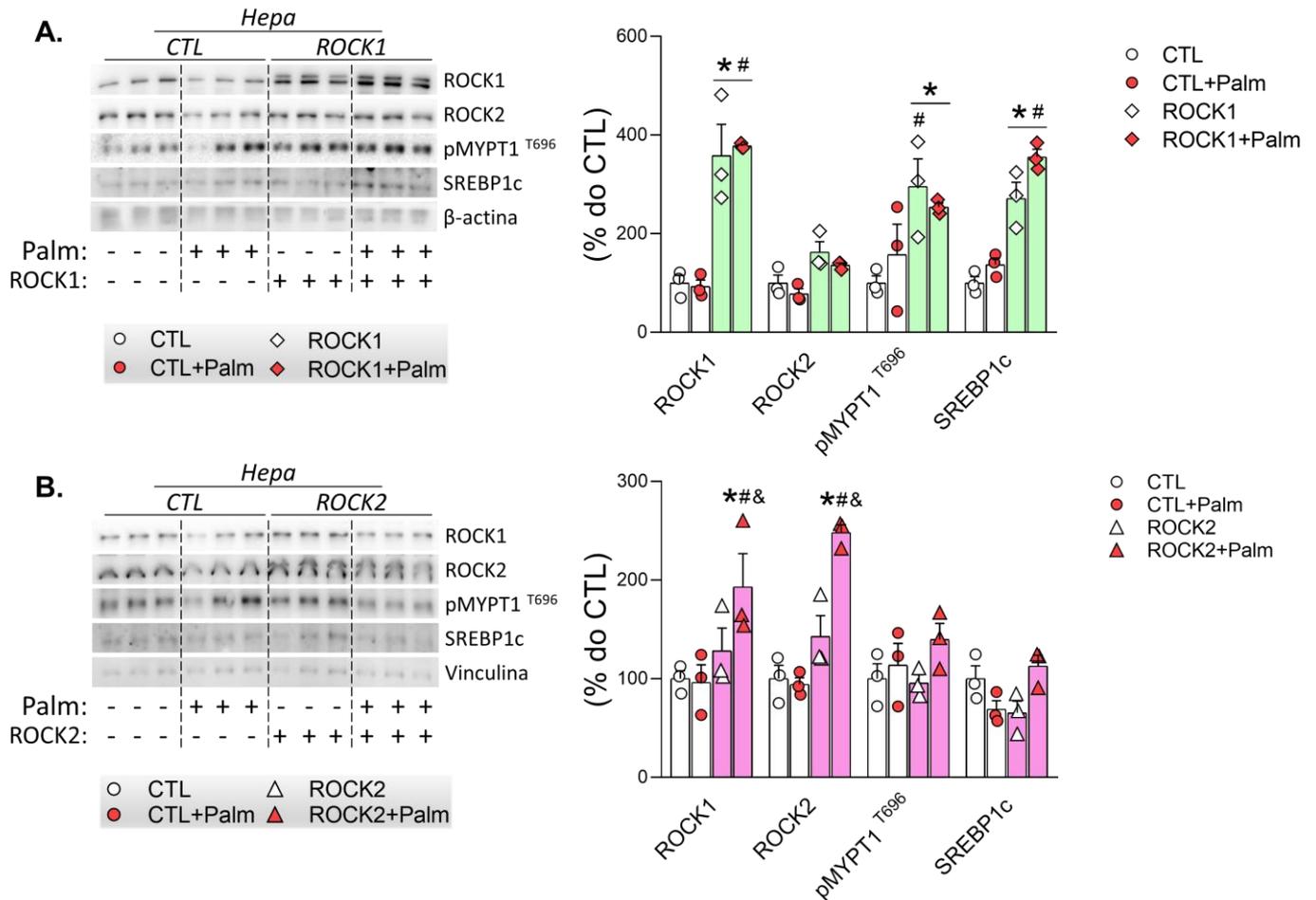


Figura 24. Superexpressão de ROCK1, mas não ROCK2 induz aumento da atividade da ROCK e do conteúdo de SREBP1c em células Hepa.

A. Superexpressão de ROCK1 em células Hepa expostas ou não a palmitato e conteúdo de ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696} e SREBP1c. B. Superexpressão de ROCK2 em células Hepa expostas ou não a palmitato e conteúdo de ROCK1, ROCK2, pMYPT1^{T696} e SREBP1c. Dados representados como a média e erro padrão da média. Para os gráficos A-B (n= 3). * p < 0.05 vs CTL. # p < 0.05 vs CTL+Palm. & p < 0.05 vs ROCK2.

9. DISCUSSÃO:

Diversos efeitos secundários do envelhecimento podem contribuir com a piora da saúde metabólica, sendo que em determinadas condições o aparecimento de doenças irão colaborar com o declínio de algumas funções fisiológicas (2). Dentre os órgãos com importante papel metabólico, o tecido hepático é fundamental no controle da homeostase glicêmica e lipídica, sendo que prejuízos neste controle podem conduzir agravos a saúde e qualidade de vida de indivíduos idosos (157). Nos últimos anos, a comunidade científica tem buscado por novas moléculas capazes de regular o acúmulo de gordura hepática e a PHG exacerbada. Além disso, o exercício físico é uma estratégia importante na modulação de vias de sinalização tecido-específicas, que consequentemente podem colaborar com a descoberta de novos alvos terapêuticos. Neste contexto, este trabalho demonstra de maneira inovadora o impacto do envelhecimento sobre a atividade da ROCK no fígado e os efeitos do exercício físico aeróbico em suprimir este efeito.

A importância da proteína ROCK para a homeostase metabólica é sustentada através de diversos estudos que apresentam a função desta proteína em diferentes tipos celulares, com diferentes finalidades (158). Entretanto, os trabalhos que investigaram os efeitos do envelhecimento sobre a proteína ROCK focaram principalmente nos ensaios descritos a seguir. Um dos efeitos clássicos de ação da proteína ROCK é sobre o aumento da contratilidade celular no tecido muscular liso (vasos, bexiga, útero e trato gastrointestinal). Estudos têm demonstrado que com o envelhecimento há um declínio da resposta de vasoconstrição, bem como aumento da atividade da ROCK na musculatura lisa em nível central e periférico (159–163). Nesse sentido, também é observado uma relação direta da proteína ROCK com a degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e com o glaucoma, sendo estas importantes doenças que afetam a visão de indivíduos idosos. Estudos demonstram um aumento da atividade da ROCK em macrófagos presentes nos olhos de camundongos idosos, na retina de camundongos idosos e em pacientes idosos com catarata (164–166). Este aumento da ROCK colabora com a polarização de macrófagos do tipo 2, com a morte de células ganglionares e com a apoptose de células epiteliais do cristalino (164–166). Sendo assim, a utilização de inibidores farmacológicos da ROCK parecem ser agentes em potencial para o tratamento de doenças oculares (167).

Diversos trabalhos também demonstram o aumento da proteína ROCK no sistema nervoso central em doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, o Parkinson e a doença de Huntington (168–173). Na Síndrome de Hutchinson-Gilford, doença genética rara que acelera drasticamente o processo de envelhecimento (~7x), a inibição farmacológica da ROCK é proposta como um tratamento para aliviar o fenótipo desta síndrome através da melhora da função mitocondrial em fibroblastos (174,175). No entanto, de maneira conflitante, outro estudo aponta que o tratamento prolongado com o inibidor farmacológico da ROCK (Y-27632) em fibroblastos de humanos, induz

um estado de senescência celular (176). Já outro estudo, que utiliza células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea provenientes de pacientes idosos, apresentaram maior atividade da ROCK, sugerindo que a ativação da ROCK pode prejudicar a formação óssea durante o envelhecimento (177).

Em relação aos trabalhos presentes na literatura que envolvem exercício físico e a ROCK, foram encontrados trabalhos focados no efeito do exercício físico em: 1) diminuir a atividade da ROCK nas artérias de camundongos ateroscleróticos (178); 2) diminuir a atividade da ROCK na substância negra do cérebro de camundongos idosos (179); 3) diminuir a atividade da ROCK em leucócitos de pacientes com doença de Huntington, com glicemia de jejum aumentada ou com dislipidemia (168,180,181). Além disso, no tecido muscular esquelético, onde a proteína ROCK contribui com a melhora da sensibilidade à insulina e captação de glicose, nosso grupo tem demonstrado de maneira pioneira o efeito do exercício físico em aumentar a atividade da ROCK neste tecido em roedores jovens, de meia-idade, idosos e obesos (70–73). Sendo assim, fica evidente a lacuna que existe na literatura de trabalhos que envolvem a temática de exercício físico, envelhecimento, metabolismo hepático e a participação da proteína ROCK neste contexto. No estudo de Wei e colaboradores, foi observado em camundongos heterozigotos de ROCK2 (ROCK2^{+/-}) com 12 meses uma maior programação termogênica no tecido adiposo branco epididimal e subcutâneo (78). Este trabalho demonstra que a atividade da ROCK2 no tecido adiposo durante o envelhecimento colabora com a adiposidade e com a piora da homeostase glicêmica. Além disso, ao expor estes camundongos ROCK2^{+/-} a dieta hiperlipídica por 14 semanas, houve menor esteatose hepática comparado com os camundongos selvagens (78).

Nesta tese de doutorado, foi demonstrado inicialmente que ratos Wistar e Fischer idosos apresentam importantes alterações hepáticas e aumento da proteína ROCK no fígado, sendo o exercício físico aeróbio capaz de atenuar este efeito. O motivo para utilização destes dois modelos foi a diferença na adiposidade adquirida com o envelhecimento. Como observado, ratos Fischer apresentam uma adiposidade menos expressiva quando idosos, diferente de ratos Wistar que apresentam um excesso de tecido adiposo e elevada massa corpórea em idades avançadas. No entanto, como observado em trabalhos prévios, ambos os modelos apresentam características do envelhecimento, como inflamação de baixo grau, hiperinsulinemia e resistência à insulina (18,182–185). Ademais, nenhum trabalho comparou estes dois modelos de roedores diretamente, com o objetivo de avaliar o metabolismo hepático durante o envelhecimento. Neste estudo, ambos os modelos apresentaram alterações importantes no fígado em resposta ao envelhecimento, sendo estas caracterizadas pelo acúmulo de triglicérides e colesterol no fígado, elevação nos níveis de TG e colesterol circulantes, aumento de marcadores inflamatórios, gliconeogênicos e lipogênicos no fígado. Ao mesmo tempo, a proteína ROCK esteve aumentada no fígado destes roedores

idosos, sugerindo uma possível relação direta da ROCK com importantes vias metabólicas no fígado. Este mesmo padrão de piora do metabolismo hepático e aumento da ROCK no fígado foi observado em camundongos C57BL/6J idosos, demonstrando que este mecanismo está preservado em roedores. Além disso, devido ao fato da ROCK estar aumentada no fígado de indivíduos com acúmulo de gordura hepática, provavelmente este mecanismo envolvendo a proteína ROCK também está preservado em humanos (186).

Nestes três modelos de roedores idosos (Fischer, Wistar e C57BL/6J), onde a ROCK demonstrou aumento com o envelhecimento, acompanhado de resistência à insulina, hiperinsulinemia e acúmulo de gordura hepática, o exercício físico aeróbio durante 7 dias foi eficiente em reverter grande parte destes eventos. Este dado corrobora com achados prévios na literatura que demonstram um efeito positivo do exercício físico sobre o acúmulo de gordura hepática (102–105). O fato de que 7 dias de exercício físico foi eficiente em roedores é consolidado por trabalhos que demonstraram um efeito do exercício na supressão da produção endógena de glicose em humanos (142,143), e também por trabalhos que demonstram que os benefícios do exercício para o fígado podem ocorrer independente de alterações na massa corpórea (98–100). Deve-se salientar que nenhum outro estudo até o momento caracterizou os efeitos do exercício físico sobre a proteína ROCK no fígado, tornando este estudo pioneiro nesta temática.

Nesse sentido, para avaliar o efeito direto da atividade da ROCK sobre o metabolismo glicêmico e hepático no envelhecimento, camundongos idosos foram tratados com o inibidor farmacológico da ROCK (Y-27632) durante 7 dias (30 mg/Kg I.P.). Este tratamento foi eficiente em diminuir a glicemia de jejum, melhorar a sensibilidade à glicose e à insulina, bem como potencializar a fosforilação do IRS1, da Akt e da GSK3 β no fígado em resposta à insulina. Além disso, foi observado diminuição no conteúdo de TG e colesterol hepático, ALT sérica, e diminuição de marcadores inflamatórios, lipogênicos e gliconeogênicos no fígado. Estes dados foram acompanhados de diminuição da atividade da ROCK no fígado e diminuição no conteúdo de SREBP1c e FAS no tecido hepático dos camundongos idosos tratados com o Y-27632. Estudos demonstram um importante efeito metabólico da inibição farmacológica da ROCK, colaborando com o controle da homeostase glicêmica (12,14,81). No entanto, estes estudos foram realizados em outros modelos experimentais que não envolvem o envelhecimento. Mesmo assim, o trabalho de Huang e colaboradores, que utilizou um modelo com deleção ou expressão constitutivamente ativa da ROCK1 especificamente no fígado de camundongos, demonstrou que a ROCK atua em um eixo ROCK/AMPK, regulando a SREBP1 (186). Outros estudos também apontam a relação próxima da ROCK com vias inflamatórias no tecido hepático (86,87,187–189). Sendo assim, nossos dados colaboram com a ideia de que a ROCK atua para uma programação inflamatória e lipogênica no fígado.

Tanto nos modelos de roedores idosos exercitados como nos camundongos idosos que receberam o inibidor farmacológico da ROCK, foi observado um aumento do gene da *Ppara*, importante proteína envolvida com a oxidação de lipídeos no fígado. Trabalhos prévios sugerem uma relação entre a proteína ROCK e a PPAR α , no entanto, um estudo que explore este mecanismo de maneira mais direta no tecido hepático poderá confirmar esta possível via de sinalização (190,191). Complementando os dados encontrados em roedores de melhora da sensibilidade à insulina e da homeostase glicêmica quando a atividade da ROCK era diminuída, observamos que a inibição da ROCK em células HepG2 potencializou a fosforilação da Akt e da GSK3 β , assim como diminuiu o conteúdo das proteínas gliconeogênicas PEPCK e G6Pase. Este mesmo comportamento foi observado em hepatócitos primários de camundongos, no estudo de Okin e Medzhitov, onde a inibição farmacológica da ROCK melhorou a fosforilação da Akt em células que foram tratadas com TNF α para induzir resistência à insulina (14).

Uma vez que foi observado uma insulinemia de jejum exacerbada nos modelos experimentais de envelhecimento, foi observado alterações no metabolismo hepático e na atividade da ROCK no fígado de camundongos *Slc2a4^{+/-}* (modelo de hiperinsulinemia). Neste modelo, o exercício físico aeróbio também foi eficiente em atenuar a atividade da ROCK no fígado e melhorar parâmetros metabólicos e hepáticos. Confirmando a importância dos efeitos prejudiciais da hiperinsulinemia sobre os hepatócitos, células HepG2 que foram expostas a insulina por um tempo prolongado, apresentaram um quadro de resistência à insulina (diminuição do pIRS1 e pAkt). No entanto, as células resistentes à insulina que foram tratadas com o inibidor farmacológico da ROCK, apresentaram uma restauração na fosforilação do IRS1 e da Akt.

Os resultados encontrados neste modelo de hiperinsulinemia conversam com estudos prévios na literatura, que apontam para o aumento da ROCK no fígado de camundongos diabéticos (Db/Db ou induzido por estreptozotocina). Este tipo de condição é caracterizado por um aumento da glicemia de jejum, assim como aumento da insulinemia como fator compensatório para a homeostase glicêmica (187,192,193). Além disso, nestes trabalhos, foi demonstrado que o inibidor farmacológico da ROCK (Fasudil) contribuiu para a melhora dos danos hepáticos nestes modelos de diabetes (187,192,193).

Levando em consideração a participação da proteína ROCK sobre o processo inflamatório em diferentes tipos celulares, o estudo de Okin e Medzhitov (2016) demonstrou que a administração de LPS (1.5 mg/Kg) durante 7 dias foi eficiente em causar uma inflamação de baixo grau e conseqüentemente aumento da glicemia de jejum (14). Após identificar um enriquecimento em genes relacionados com a metabolização de drogas em hepatócitos com inflamação, os autores observaram que a inflamação de baixo grau diminuiu a proteína CYP7a1 (citocromo P450 7A1). Uma vez que a CYP7a1 está envolvida na biossíntese de ácido biliar, a diminuição da CYP7a1

pode colaborar com o acúmulo de metabólitos intermediários da via do mevalonato (Farnesil Pirofosfato e Geranilgeranil Pirofosfato). Neste estudo, estes metabólitos apresentaram ação direta na isoprenilação da RhoC (proteína precursora da atividade da ROCK), que facilita sua translocação para a membrana celular e conseqüentemente estimulando a atividade da ROCK (14). Isto foi confirmado pela capacidade de inibidores de preniltransferases impedirem o aumento de RhoC e da atividade da ROCK em resposta a TNF α em hepatócitos primários. Também foi proposto que este aumento nos níveis de RhoC é dependente da atividade transcricional do NF- κ B (14). Por fim, os autores utilizaram o inibidor farmacológico da ROCK (Y-27632) em camundongos que receberam LPS por 7 dias e também em camundongos que receberam dieta hiperlipídica por 12 semanas e encontraram diminuição da glicemia de jejum e melhora da homeostase glicêmica (14). Sendo assim, a inflamação hepática pode ser um importante fator que colabora com a atividade da ROCK no fígado, com a piora da via de sinalização da insulina neste tecido e com o aumento da glicemia de jejum.

Em nosso trabalho, procuramos investigar se o exercício físico aeróbio pode ser uma estratégia eficiente na regulação da atividade da proteína ROCK no fígado de camundongos com inflamação de baixo grau induzida por LPS. A administração de LPS foi eficiente em aumentar a glicemia de jejum, causar intolerância à glicose, diminuir a sinalização da insulina no fígado e aumentar o conteúdo de ROCK1 e a atividade da ROCK no fígado. Interessantemente, o exercício físico aeróbio negou estes efeitos. Estes dados confirmam que a proteína ROCK está associada com uma inflamação de baixo grau, onde há prejuízos metabólicos e hepáticos. Em contraste, o exercício físico apresenta-se como uma estratégia eficiente na regulação desta condição de estresse metabólico.

Parte dos trabalhos que investigaram o papel da proteína ROCK no fígado, têm relacionado esta proteína em condições de fibrose hepática. Estes estudos demonstraram uma participação importante da proteína ROCK na fibrose hepática induzida por CCL₄ ou Tioacetamida, já que a sua inibição farmacológica (Y-27632, Fasudil e HA-1077) proveu um papel protetor sobre o desenvolvimento de fibrose no fígado (189,194–196). Além disso, também foi demonstrado que em condições de estresse hepático (lesão de isquemia/reperfusão, LPS ou CCL₄), há um aumento da proteína ROCK1 nos macrófagos presentes no fígado, que colaboram com a sustentação da inflamação e do dano hepático (88,197). Sendo assim, confirmando um importante papel da proteína ROCK no controle da inflamação hepática em células do sistema imune presentes no fígado.

Em nosso trabalho, a fibrose hepática induzida por CCL₄ resultou em aumento da atividade da ROCK no fígado. No entanto, este é o primeiro estudo demonstrando o efeito benéfico do exercício físico aeróbio em impedir o aumento da atividade da ROCK na situação de fibrose

hepática. Nesse sentido, a utilização de fármacos já conhecidos combinados com o exercício físico aeróbio, podem ser uma eficiente estratégia para melhorar o metabolismo hepático em pacientes com fibrose, sendo que a proteína ROCK pode ter participação chave neste processo.

A participação da proteína ROCK sobre a esteatose hepática foi descrita por trabalhos que demonstraram que a ROCK responde a ácidos graxos em cultivo celular (13,86), bem como responde a uma dieta hiperlipídica em camundongos (12,15,87). Camundongos com a ROCK1 constitutivamente ativa no fígado apresentaram maior lipogênese hepática em resposta a uma dieta hiperlipídica (15). Por outro lado, camundongos expostos a uma dieta hiperlipídica com deleção da ROCK1 especificamente no fígado, ou tratados com o inibidor da ROCK (Fasudil ou RKI-1447), apresentaram menor acúmulo de gordura hepática e melhora da homeostase glicêmica (12,15,87). Estes benefícios metabólicos da inibição da ROCK, também foi observado em outros modelos experimentais de obesidade onde a inibição da ROCK foi eficiente em melhorar o metabolismo glicêmico e lipídico (80,81,198). Por mais que nosso estudo seja focado nos efeitos do envelhecimento e do exercício físico aeróbio sobre a proteína ROCK, não podemos descartar que indivíduos idosos podem apresentar obesidade e acúmulo de gordura hepática como consequência de um excesso de calorias ingeridas. Sendo assim, nós confirmamos que a atividade da ROCK está aumentada no fígado de camundongos *Ob/Ob* e camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Porém, quando exercitados cronicamente, há diminuição da atividade da ROCK no fígado. Também observamos que a ROCK responde à administração de palmitato em células HepG2, assim como observamos que a superexpressão de ROCK1 em células Hepa na presença ou não de palmitato, parece ser mais importante para a atividade da ROCK e para uma programação lipogênica.

O conjunto destes dados demonstram que parece haver uma relação direta da proteína ROCK com o controle da saúde metabólica e com o metabolismo hepático no envelhecimento. Neste projeto os principais achados foram: 1) Na situação de envelhecimento associado ou não ao aumento da massa corpórea, na hiperinsulinemia, na inflamação de baixo grau (induzida por LPS), na fibrose hepática (induzida por CCL₄) e na obesidade a atividade da ROCK está aumentada no fígado; 2) O exercício físico aeróbio foi eficiente em diminuir a atividade da ROCK no tecido hepático em todas estas condições de descontrole metabólico; 3) O aumento da atividade da ROCK no fígado, sempre foi acompanhado de piora na homeostase glicêmica e da modulação de marcadores lipogênicos e gliconeogênicos no tecido hepático, sendo o exercício físico capaz de reverter este fenômeno; 4) A inibição farmacológica da ROCK foi eficiente em melhorar o controle glicêmico e a sensibilidade à insulina, bem como atenuar marcadores gliconeogênicos e lipogênicos no fígado de camundongos idosos (Figura 25). Por fim, este estudo foi pioneiro na descrição do papel da ROCK influenciando a homeostase glicêmica e a sinalização da insulina

hepática, acompanhada de aumento de marcadores gliconeogênicos e lipogênicos no fígado de roedores idosos. Por outro lado, o exercício físico aeróbio se demonstrou como uma estratégia eficiente na regulação da proteína ROCK, atenuando os efeitos deletérios mediados por esta via de sinalização no fígado e, por fim, melhorando a homeostase glicêmica no envelhecimento.

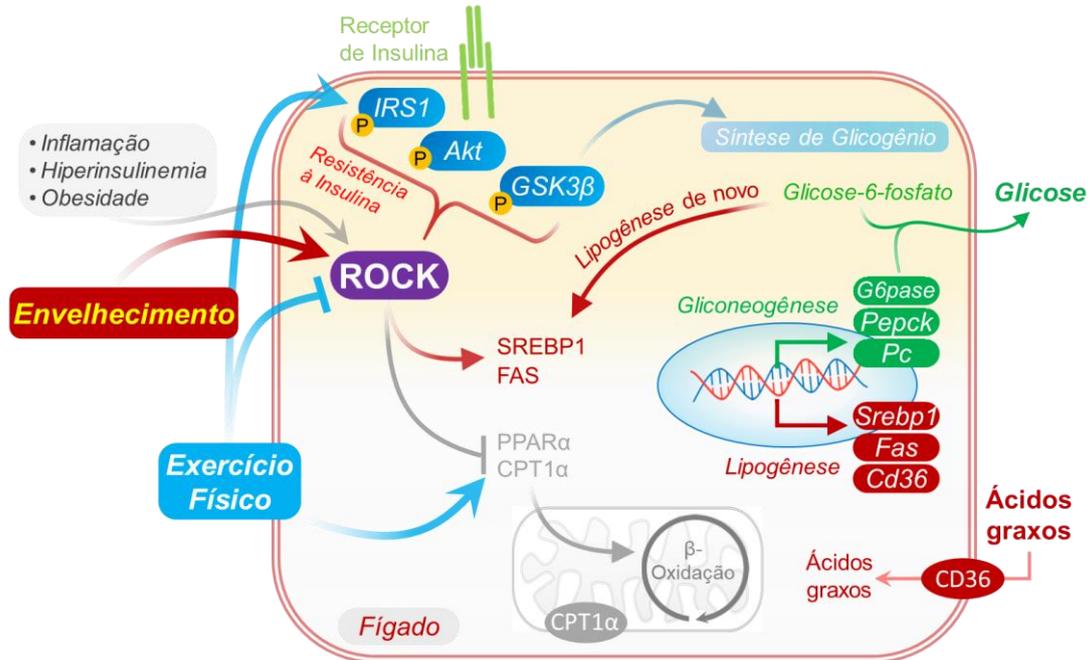


Figura 25. Resumo gráfico desta tese de doutorado que buscou investigar o papel do exercício físico na regulação da proteína ROCK no tecido hepático na situação de envelhecimento.

O envelhecimento potencializou a atividade da ROCK no fígado de roedores idosos, a qual esteve associada com a piora da sinalização da insulina (pIRS1/pAkt/pGSK3β) e com uma programação lipogênica (SREBP1/FAS/CD36) e gliconeogênicas (G6Pase/PEPCK/PC) no tecido hepático. Em outras condições de estresse metabólico, como, por exemplo na inflamação de baixo grau, na hiperinsulinemia ou na obesidade, a via de sinalização da ROCK também colabora com o descontrole do metabolismo hepático. Em contraste, o exercício físico foi eficiente na atenuação da atividade da ROCK no fígado, ajudando a explicar as melhoras na homeostase glicêmica e na sensibilidade à insulina presente em roedores exercitados. *Figura de autoria própria.*

10. REFERÊNCIAS:

- 1 **Lutz W** *et al.* The coming acceleration of global population ageing. *Nature* 2008;451:716–9.
- 2 **López-Otín C** *et al.* The hallmarks of aging. *Cell* 2013;153.
- 3 **Strasser B** *et al.* Role of Dietary Protein and Muscular Fitness on Longevity and Aging. *Aging Dis* 2018;9:119–32.
- 4 **Baker DJ** *et al.* Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J Clin Invest* 2018;128:1208–16.
- 5 **Wang H** *et al.* Insulin Signaling and Glucose Uptake in the Soleus Muscle of 30-Month-Old Rats After Calorie Restriction With or Without Acute Exercise. 2016;71:323–32.
- 6 **Rivas DA** *et al.* Diminished anabolic signaling response to insulin induced by intramuscular lipid accumulation is associated with inflammation in aging but not obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2016;310:R561-9.
- 7 **Gong Z** *et al.* Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease in aging. *Mol Cell Endocrinol* 2017;455:115–30.
- 8 **Bonora E.** Relationship between regional fat distribution and insulin resistance. *Int J Obes* 2000;24:32–5.
- 9 **Utzsneider KM** *et al.* Impact of intra-abdominal fat and age on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes* 2004;53:2867–72.
- 10 **Huang H** *et al.* Metabolic actions of Rho-kinase in periphery and brain. 2013.
- 11 **Riento K** *et al.* Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:446–56.
- 12 **Noda K** *et al.* Rho-kinase inhibition ameliorates metabolic disorders through activation of AMPK pathway in mice. *PLoS One* 2014;9:e110446.
- 13 **Ma Z** *et al.* Paeoniflorin suppresses lipid accumulation and alleviates insulin resistance by regulating the Rho kinase/IRS-1 pathway in palmitate-induced HepG2Cells. *Biomed Pharmacother* 2017;90:361–7.
- 14 **Okin D** *et al.* The Effect of Sustained Inflammation on Hepatic Mevalonate Pathway Results in Hyperglycemia. *Cell* 2016;165:343–56.
- 15 **Huang H** *et al.* Rho kinase/AMPK axis regulates hepatic lipogenesis during overnutrition. *J Clin Invest* Published Online First: 18 September 2018.
- 16 **Muñoz VR** *et al.* Exercise decreases CLK2 in the liver of obese mice and prevents hepatic fat accumulation. *J Cell Biochem* Published Online First: 2018.
- 17 **Muñoz VR** *et al.* Physical exercise reduces pyruvate carboxylase (PCB) and contributes to hyperglycemia reduction in obese mice. *J Physiol Sci* Published Online First: 2017.
- 18 **de Moura LP** *et al.* Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats. *Immun Ageing* 2013;10:8.
- 19 **Botezelli JD** *et al.* Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. *Sci Rep* 2016;6:31106.
- 20 **Kwak M-S** *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. *Korean J Intern Med* 2018;33:64–74.
- 21 **van der Windt DJ** *et al.* The Effects of Physical Exercise on Fatty Liver Disease. *Gene Expr* Published Online First: 6 December 2017.
- 22 **Medrano M** *et al.* Evidence-Based Exercise Recommendations to Reduce Hepatic Fat Content in Youth- a Systematic Review and Meta-Analysis. *Prog Cardiovasc Dis* Published Online First: 13 February 2018.
- 23 **Marinho R** *et al.* Regulation of hepatic TRB3/Akt interaction induced by physical exercise and its effect on the hepatic glucose production in an insulin resistance state. *Diabetol Metab Syndr* 2015;7:67.
- 24 **de Moura LP** *et al.* Moderate physical activity from childhood contributes to metabolic health and reduces hepatic fat accumulation in adult rats. *Lipids Health Dis* 2013;12:29.
- 25 **Noroozi R** *et al.* DNA methylation-based age clocks: From age prediction to age reversion. *Ageing Res Rev* 2021;68:101314.

- 26 **Rajman L et al.** Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab* 2018;27:529–47.
- 27 **Ocampo A et al.** In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* 2016;167:1719-1733.e12.
- 28 **Lu Y et al.** Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* 2020;588:124–9.
- 29 **Fahy GM et al.** Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans. *Aging Cell* 2019;18.
- 30 **Gan L et al.** Mechanisms and Implications of Age-Related Changes in the Liver: Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the Elderly. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2011;2011:1–12.
- 31 **Zoli M et al.** Total and functional hepatic blood flow decrease in parallel with ageing. *Age Ageing* 1999;28:29–33.
- 32 **Wynne HA et al.** The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology* 1989;9:297–301.
- 33 **Schmucker DL.** Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease? *Exp Gerontol*;40:650–9.
- 34 **Wakabayashi H et al.** Evaluation of the effect of age on functioning hepatocyte mass and liver blood flow using liver scintigraphy in preoperative estimations for surgical patients: comparison with CT volumetry. *J Surg Res* 2002;106:246–53.
- 35 **Seitz HK et al.** Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol Chem* 2006;387:349–60.
- 36 **Mahrouf-Yorgov M et al.** Increased susceptibility to liver fibrosis with age is correlated with an altered inflammatory response. *Rejuvenation Res* 2011;14:353–63.
- 37 **Cevenini E et al.** Inflamm-aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013;16:14–20.
- 38 **Sanz N et al.** Age-related changes on parameters of experimentally-induced liver injury and regeneration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;154:40–9.
- 39 **Sastre J et al.** Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 1996;24:1199–205.
- 40 **Koehler EM et al.** Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in the elderly: results from the Rotterdam study. *J Hepatol* 2012;57:1305–11.
- 41 **Chalasani N et al.** The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Gastroenterology* 2012;142:1592–609.
- 42 **Kagansky N et al.** Non-alcoholic fatty liver disease - a common and benign finding in octogenarian patients. *Liver Int* 2004;24:588–94.
- 43 **Hunt NJ et al.** Hallmarks of Aging in the Liver. *Comput Struct Biotechnol J* 2019;17:1151–61.
- 44 **Saltiel AR et al.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001;414:799–806.
- 45 **Hunter SJ et al.** Insulin action and insulin resistance: Diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med* 1998;105:331–45.
- 46 **Frayn KN et al.** Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem* 2006;42:89–103.
- 47 **Morton GJ et al.** Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443:289–95.
- 48 **White MF.** The IRS-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* 1998;182:3–11.
- 49 **Esposito DL et al.** Tyr612 and Tyr632 in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocation of GLUT4 in adipose cells. *Endocrinology* 2001;142:2833–40.
- 50 **Gual P et al.** Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1

- phosphorylation. *Biochimie* 2005;87:99–109.
- 51 **Danielsson A et al.** Phosphorylation of IRS1 at serine 307 and serine 312 in response to insulin in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:1183–7.
- 52 **Stephens L et al.** Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 1998;279:710–4.
- 53 **Alessi DR et al.** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996;15:6541–51.
- 54 **Samuel VT et al.** Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab* 2018;27:22–41.
- 55 **Kumashiro N et al.** Targeting Pyruvate Carboxylase Reduces Gluconeogenesis and Adiposity and Improves Insulin Resistance. *Diabetes* 2013;62:2183–94.
- 56 **Perry RJ et al.** Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell* 2015;160:745–58.
- 57 **Samuel VT et al.** The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* 2016;126:12–22.
- 58 **Samuel VT et al.** Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metab* 2018;27:22–41.
- 59 **Nakagawa O et al.** ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 1996;392:189–93.
- 60 **Leung T et al.** A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* 1995;270:29051–4.
- 61 **Riento K et al.** RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 2003;23:4219–29.
- 62 **Rikitake Y et al.** Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 2005;97:1232–5.
- 63 **Amano M et al.** Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 1996;271:20246–9.
- 64 **Kimura K et al.** Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996;273:245–8.
- 65 **Yang N et al.** Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* 1998;393:809–12.
- 66 **Takai Y et al.** Rho small G protein and cytoskeletal control. *Princess Takamatsu Symp* 1994;24:338–50.
- 67 **Ridley AJ.** Signal transduction through the GTP-binding proteins Rac and Rho. *J Cell Sci Suppl* 1994;18:127–31.
- 68 **Lee DHH et al.** Targeted disruption of ROCK1 causes insulin resistance in vivo. *J Biol Chem* 2009;284:11776–80.
- 69 **Furukawa N et al.** Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. *Cell Metab* 2005;2:119–29.
- 70 **Muñoz VR et al.** Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. *J Cell Physiol* 2018;233:4791–800.
- 71 **Muñoz VR et al.** Physical exercise increases ROCK activity in the skeletal muscle of middle-aged rats. *Mech Ageing Dev* 2020;186.
- 72 **Muñoz VR et al.** Rho-kinase activity is upregulated in the skeletal muscle of aged exercised rats. *Exp Gerontol* 2019;128.
- 73 **Muñoz VR et al.** Exercise Counterbalances Rho/ROCK2 Signaling Impairment in the Skeletal Muscle and Ameliorates Insulin Sensitivity in Obese Mice. *Front Immunol* Published Online First: 2021.
- 74 **Lee S-H et al.** ROCK1 isoform-specific deletion reveals a role for diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;306:E332-43.
- 75 **Hara Y et al.** Rho and Rho-kinase activity in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch. *Sci Signal* 2011;4:ra3.
- 76 **Nakayama Y et al.** RhoA induces expression of inflammatory cytokine in adipocytes. *Biochem*

- Biophys Res Commun* 2009;379:288–92.
- 77 **Soliman H et al.** Attenuation of obesity-induced insulin resistance in mice with heterozygous deletion of ROCK2. *Int J Obes* 2016;40:1435–43.
- 78 ROCK2 inhibition enhances the thermogenic program in white and brown fat tissue in mice.
- 79 **Lin GG et al.** Increased Rho Kinase Activity in a Taiwanese Population With Metabolic Syndrome. 2012;100:130–4.
- 80 **Kanda T et al.** Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension. *FASEB J* 2006;20:169–71.
- 81 **Kikuchi Y et al.** A Rho-kinase inhibitor, fasudil, prevents development of diabetes and nephropathy in insulin-resistant diabetic rats. *J Endocrinol* 2007;192:595–603.
- 82 **Hirsova P et al.** Lipid-Induced Signaling Causes Release of Inflammatory Extracellular Vesicles from Hepatocytes. *Gastroenterology* 2016;150:956–67.
- 83 **Xue W et al.** Alkannin Inhibited Hepatic Inflammation in Diabetic Db/Db Mice. *Cell Physiol Biochem* 2018;45:2461–70.
- 84 **Murata T et al.** Therapeutic significance of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, on the established liver fibrosis. *J Surg Res* 2003;114:64–71.
- 85 **Xie Y et al.** Fasudil alleviates hepatic fibrosis in type 1 diabetic rats: Involvement of the inflammation and RhoA/ROCK pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:5665–77.
- 86 **Chen X et al.** LncRNA NEAT1 promotes hepatic lipid accumulation via regulating miR-146a-5p/ROCK1 in nonalcoholic fatty liver disease. *Life Sci* 2019;235:116829.
- 87 **Wang J et al.** The effects of RKI-1447 in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease induced by a high-fat diet and in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells treated with oleic acid. *Med Sci Monit* 2020;26:1–17.
- 88 **Wei S et al.** RIP3 deficiency alleviates liver fibrosis by inhibiting ROCK1–TLR4–NF-κB pathway in macrophages. *FASEB J* 2019;33:11180–93.
- 89 **Han QJ et al.** Fasudil prevents liver fibrosis via activating natural killer cells and suppressing hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2021;27:3581–94.
- 90 **Jiang C et al.** Cyclocarya paliurus Triterpenoids Improve Diabetes-Induced Hepatic Inflammation via the Rho-Kinase-Dependent Pathway. *Front Pharmacol* 2019;10:1–13.
- 91 **Ikeda H et al.** Rho-kinase inhibitor prevents hepatocyte damage in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:911–7.
- 92 **Thyfault JP et al.** Exercise combats hepatic steatosis: Potential mechanisms and clinical implications. *Diabetes* Published Online First: 2020.
- 93 **Hawley JAA et al.** Integrative biology of exercise. *Cell* 2014;159:738–49.
- 94 **Trefts E et al.** Exercise and the Regulation of Hepatic Metabolism. In: *Progress in molecular biology and translational science*. 2015. 203–25.
- 95 **Alex S et al.** Exercise training improves liver steatosis in mice. *Nutr Metab (Lond)* 2015;12:29.
- 96 **PÄLVE KS et al.** Cardiorespiratory Fitness and Risk of Fatty Liver. *Med Sci Sport Exerc* 2017;49:1834–41.
- 97 **Church TS et al.** Association of Cardiorespiratory Fitness, Body Mass Index, and Waist Circumference to Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2006;130:2023–30.
- 98 **Lee S et al.** Effects of Aerobic Versus Resistance Exercise Without Caloric Restriction on Abdominal Fat, Intrahepatic Lipid, and Insulin Sensitivity in Obese Adolescent Boys: A Randomized, Controlled Trial. *Diabetes* 2012;61:2787–95.
- 99 **Bacchi E et al.** Both resistance training and aerobic training reduce hepatic fat content in type 2 diabetic subjects with nonalcoholic fatty liver disease (the RAED2 randomized trial). *Hepatology* 2013;58:1287–95.
- 100 **Hashida R et al.** Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *J Hepatol* 2017;66:142–52.
- 101 **Xiong Y et al.** Effect of Different Exercise Methods on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:3242.
- 102 **Thorp A et al.** Exercise as Medicine: The Impact of Exercise Training on Nonalcoholic Fatty

- Liver Disease. *Curr Hepatol Reports* 2020;19:402–11.
- 103 **Nath P et al.** Effect of Exercise on NAFLD and Its Risk Factors: Comparison of Moderate versus Low Intensity Exercise. *J Clin Transl Hepatol* 2020;8:120–6.
- 104 **Zhang H-J et al.** Effects of Moderate and Vigorous Exercise on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *JAMA Intern Med* 2016;176:1074.
- 105 **Wang S et al.** Physical activity intervention for non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Gastroenterol* 2020;20:66.
- 106 **Sullivan S et al.** Randomized trial of exercise effect on intrahepatic triglyceride content and lipid kinetics in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012;55:1738–45.
- 107 **Vilar-Gomez E et al.** Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2015;149:367-378.e5.
- 108 **Promrat K et al.** Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:121–9.
- 109 **Thyfault JP et al.** Exercise and metabolic health: beyond skeletal muscle. *Diabetologia* 2020;63:1464–74.
- 110 **Pinto AP et al.** Impact of Different Physical Exercises on the Expression of Autophagy Markers in Mice. *Int J Mol Sci* 2021;22:2635.
- 111 **da Rocha AL et al.** Moderate, but Not Excessive, Training Attenuates Autophagy Machinery in Metabolic Tissues. *Int J Mol Sci* 2020;21:8416.
- 112 **Vieira RFL et al.** Time-restricted feeding combined with aerobic exercise training can prevent weight gain and improve metabolic disorders in mice fed a high-fat diet. *J Physiol* 2021;;JP280820.
- 113 **Cersosimo E et al.** Renal glucose production during insulin-induced hypoglycemia in humans. *Diabetes* 1999;48:261–6.
- 114 **Ekberg K et al.** Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes* 1999;48:292–8.
- 115 **Meyer C et al.** Effects of physiological hyperinsulinemia on systemic, renal, and hepatic substrate metabolism. *Am J Physiol Physiol* 1998;275:F915–21.
- 116 **DeFronzo RA et al.** Influence of hyperinsulinemia, hyperglycemia, and the route of glucose administration on splanchnic glucose exchange. *Proc Natl Acad Sci* 1978;75:5173–7.
- 117 **Pagliassotti MJ et al.** Comparison of the time courses of insulin and the portal signal on hepatic glucose and glycogen metabolism in the conscious dog. *J Clin Invest* 1996;97:81–91.
- 118 **Gastaldelli A et al.** Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study. *Diabetes* 2000;49:1367–73.
- 119 **Basu R et al.** Obesity and Type 2 Diabetes Impair Insulin-Induced Suppression of Glycogenolysis as Well as Gluconeogenesis. *Diabetes* 2005;54:1942–8.
- 120 **Wahren J et al.** Glucose metabolism during leg exercise in man. *J Clin Invest* 1971;50:2715–25.
- 121 **Bergeron R et al.** Glucose production during exercise in humans: a-hv balance and isotopic-tracer measurements compared. *J Appl Physiol* 1999;87:111–5.
- 122 **Singhal P et al.** Regulation of endogenous glucose production after a mixed meal in type 2 diabetes. *Am J Physiol Metab* 2002;283:E275–83.
- 123 **Wasserman DH et al.** Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am J Physiol Metab* 1989;257:E108–17.
- 124 **Ferrannini E et al.** Splanchnic and renal metabolism of insulin in human subjects: a dose-response study. *Am J Physiol Metab* 1983;244:E517–27.
- 125 **Basu R et al.** Obesity and type 2 diabetes impair insulin induced suppression of glycogenolysis as well as gluconeogenesis. *Diabetes* 2005;54:1942–8.
- 126 **Gastaldelli A et al.** Influence of Obesity and Type 2 Diabetes on Gluconeogenesis and Glucose Output in Humans A Quantitative Study. *Diabetes* 2000;49:1367–73.
- 127 **DeFronzo RA et al.** Effect of physical training on insulin action in obesity. *Diabetes* 1987;36:1379–85.

- 128 **Barzilai N et al.** Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin. *J Biol Chem* 1993;268:25019–25.
- 129 **Clore JN et al.** Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;49:969–74.
- 130 **Caro J et al.** Liver Glucokinase: Decreased Activity in Patients with Type II Diabetes. *Horm Metab Res* 1995;27:19–22.
- 131 **Magnusson I et al.** Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest* 1992;90:1323–7.
- 132 **Adkins A et al.** Higher Insulin Concentrations Are Required to Suppress Gluconeogenesis Than Glycogenolysis in Nondiabetic Humans. *Diabetes* 2003;52:2213–20.
- 133 **Gastaldelli A et al.** Effect of Physiological Hyperinsulinemia on Gluconeogenesis in Nondiabetic Subjects and in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* 2001;50:1807–12.
- 134 **Satapati S et al.** Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver. *J Clin Invest* 2015;125:4447–62.
- 135 **Ramnanan CJ et al.** Molecular Characterization of Insulin-Mediated Suppression of Hepatic Glucose Production In Vivo. *Diabetes* 2010;59:1302–11.
- 136 **Burgess SC et al.** Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Does Not Solely Control the Rate of Hepatic Gluconeogenesis in the Intact Mouse Liver. *Cell Metab* 2007;5:313–20.
- 137 **Bogardus C et al.** Effects of Physical Training and Diet Therapy on Carbohydrate Metabolism in Patients with Glucose Intolerance and Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Diabetes* 1984;33:311–8.
- 138 **Rodnick KJ et al.** Improved insulin action in muscle, liver, and adipose tissue in physically trained human subjects. *Am J Physiol Metab* 1987;253:E489–95.
- 139 **Segal KR et al.** Effect of exercise training on insulin sensitivity and glucose metabolism in lean, obese, and diabetic men. *J Appl Physiol* 1991;71:2402–11.
- 140 **Meex RCR et al.** Restoration of Muscle Mitochondrial Function and Metabolic Flexibility in Type 2 Diabetes by Exercise Training Is Paralleled by Increased Myocellular Fat Storage and Improved Insulin Sensitivity. *Diabetes* 2010;59:572–9.
- 141 **Shojaee-Moradie F et al.** Exercise training reduces fatty acid availability and improves the insulin sensitivity of glucose metabolism. *Diabetologia* 2007;50:404–13.
- 142 **Kirwan JP et al.** Effects of 7 days of exercise training on insulin sensitivity and responsiveness in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Metab* 2009;297:E151–6.
- 143 **Black SE et al.** Improved insulin action following short-term exercise training: role of energy and carbohydrate balance. *J Appl Physiol* 2005;99:2285–93.
- 144 **Warner SO et al.** Exercise-Induced Improvements to Whole Body Glucose Metabolism in Type 2 Diabetes: The Essential Role of the Liver. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11.
- 145 **Pereira RM et al.** Strength exercise reduces hepatic pyruvate carboxylase and gluconeogenesis in DIO mice. *J Endocrinol* 2020;247:127–38.
- 146 **Gaspar RC et al.** Aging is associated with increased TRB3, ER stress, and hepatic glucose production in the liver of rats. *Exp Gerontol* 2020;139:111021.
- 147 **da Cruz Rodrigues KC et al.** Short-Term Strength Exercise Reduces Hepatic Insulin Resistance in Obese Mice by Reducing PTP1B Content, Regardless of Changes in Body Weight. *Int J Mol Sci* 2021;22:6402.
- 148 **Semmler G et al.** Diet and Exercise in NAFLD/NASH: Beyond the Obvious. *Liver Int* 2021;:liv.15024.
- 149 **Seo DY et al.** Hepatokines as a Molecular Transducer of Exercise. *J Clin Med* 2021;10:385.
- 150 **Zou Y et al.** Understanding the Role of Exercise in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: ERS-Linked Molecular Pathways. *Mediators Inflamm* 2020;2020:1–15.
- 151 **Thyfault JP et al.** Exercise Combats Hepatic Steatosis: Potential Mechanisms and Clinical Implications. *Diabetes* 2020;69:517–24.
- 152 **Sambrook J et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

- 153 **Dutta S** *et al.* Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* 2016.
- 154 **Kawanaka K** *et al.* Changes in insulin-stimulated glucose transport and GLUT-4 protein in rat skeletal muscle after training. *J Appl Physiol* 1997;83:2043–7.
- 155 **Folch J** *et al.* A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *J Biol Chem* 1957;226:497–509.
- 156 **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- 157 **Roden M** *et al.* The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature* 2019;576:51–60.
- 158 **Amano M** *et al.* Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res* 2000;261:44–51.
- 159 **Roks AJM** *et al.* Notch–Rho–cGMP interaction: common point of convergence in microvascular aging-related disease. *Clin Sci* 2021;135:1209–12.
- 160 **Björling K** *et al.* Role of age, Rho-kinase 2 expression, and G protein-mediated signaling in the myogenic response in mouse small mesenteric arteries. *Physiol Rep* 2018;6:e13863.
- 161 **Seawright JW** *et al.* Vascular Smooth Muscle Contractile Function Declines With Age in Skeletal Muscle Feed Arteries. *Front Physiol* 2018;9.
- 162 **De Silva TM** *et al.* Changes in Cerebral Arteries and Parenchymal Arterioles With Aging. *Hypertension* 2018;71:921–7.
- 163 **Kirschstein T** *et al.* Inverse relationship of Rho kinase and myosin-light chain kinase expression in the aging human detrusor smooth muscle. *BMC Urol* 2015;15:104.
- 164 **Zandi S** *et al.* ROCK-Isoform-Specific Polarization of Macrophages Associated with Age-Related Macular Degeneration. *Cell Rep* 2015;10:1173–86.
- 165 **Kashiwagi K** *et al.* A Ser75-to-Asp phospho-mimicking mutation in Src accelerates ageing-related loss of retinal ganglion cells in mice. *Sci Rep* 2017;7:16779.
- 166 **Hu S** *et al.* High-expression of ROCK1 modulates the apoptosis of lens epithelial cells in age-related cataracts by targeting p53 gene. *Mol Med* 2020;26:124.
- 167 **Moura-Coelho N** *et al.* Rho kinase inhibitors—a review on the physiology and clinical use in Ophthalmology. *Graefe’s Arch Clin Exp Ophthalmol* 2019;257:1101–17.
- 168 **Narayanan KL** *et al.* Rho Kinase Pathway Alterations in the Brain and Leukocytes in Huntington’s Disease. *Mol Neurobiol* 2016;53:2132–40.
- 169 **Saal K-A** *et al.* Altered Expression of Growth Associated Protein-43 and Rho Kinase in Human Patients with Parkinson’s Disease. *Brain Pathol* 2017;27:13–25.
- 170 **Zhang T** *et al.* Identification of key transcriptome biomarkers based on a vital gene module associated with pathological changes in Alzheimer’s disease. *Aging (Albany NY)* 2021;13:14940–67.
- 171 **Zheng K** *et al.* miR-135a-5p mediates memory and synaptic impairments via the Rock2/Adducin1 signaling pathway in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Nat Commun* 2021;12:1903.
- 172 **Henderson BW** *et al.* Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1) is increased in Alzheimer’s disease and ROCK1 depletion reduces amyloid- β levels in brain. *J Neurochem* 2016;138:525–31.
- 173 **Chen Y** *et al.* β -Asarone prevents autophagy and synaptic loss by reducing ROCK expression in asenescence-accelerated prone 8 mice. *Brain Res* 2014;1552:41–54.
- 174 **Kang HT** *et al.* Chemical screening identifies ROCK as a target for recovering mitochondrial function in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell* 2017;16:541–50.
- 175 **Park JT** *et al.* A crucial role of ROCK for alleviation of senescence-associated phenotype. *Exp Gerontol* 2018;106:8–15.
- 176 **Li X** *et al.* Prolonged treatment with Y-27632 promotes the senescence of primary human dermal fibroblasts by increasing the expression of IGFBP-5 and transforming them into a CAF-like phenotype. *Aging (Albany NY)* 2020;12:16621–46.
- 177 **Shi W** *et al.* RhoA/Rock activation represents a new mechanism for inactivating Wnt/ β -catenin signaling in the aging-associated bone loss. *Cell Regen (London, England)* 2021;10:8.

- 178 **Matsumoto A et al.** Effects of exercise training and RhoA/ROCK inhibition on plaque in ApoE^{-/-} mice. *Int J Cardiol* 2013;167:1282–8.
- 179 **Muñoz A et al.** Aging-related Increase in Rho Kinase Activity in the Nigral Region Is Counteracted by Physical Exercise. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 2016;71:1254–7.
- 180 **Liao H et al.** Effects and mechanism of moderate aerobic exercise on impaired fasting glucose improvement. *Lipids Health Dis* 2015;14:157.
- 181 **Bai H et al.** Association of moderate aerobic exercise and rho-associated kinase 2 concentration in subjects with dyslipidemia. *Arch Med Sci* 2017;4:807–12.
- 182 **Muñoz VR et al.** The Effects of Aging on Rho-Kinase and Insulin Signaling in Skeletal Muscle and White Adipose Tissue of Rats. *Journals Gerontol Ser A* 2018;75.
- 183 **Sharma N et al.** Heterogeneous Effects of Calorie Restriction on In Vivo Glucose Uptake and Insulin Signaling of Individual Rat Skeletal Muscles. *PLoS One* 2013;8.
- 184 **Park Y et al.** Effects of aging, TNF- α , and exercise training on angiotensin II-induced vasoconstriction of rat skeletal muscle arterioles. *J Appl Physiol* 2012;113:1091–100.
- 185 **Carvalho CR et al.** Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996;137:151–9.
- 186 **Huang H et al.** Rho-kinase/AMPK axis regulates hepatic lipogenesis during overnutrition. *J Clin Invest* 2018;128:5335–50.
- 187 **Xie Y et al.** Fasudil alleviates hepatic fibrosis in type 1 diabetic rats: involvement of the inflammation and RhoA/ROCK pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:5665–77.
- 188 **Wei S et al.** RIP3 deficiency alleviates liver fibrosis by inhibiting ROCK1–TLR4–NF- κ B pathway in macrophages. *FASEB J* 2019;33:11180–93.
- 189 **Han Q-J et al.** Fasudil prevents liver fibrosis via activating natural killer cells and suppressing hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2021;27:3581–94.
- 190 **Wu L et al.** Glucagon-like peptide-1 ameliorates cardiac lipotoxicity in diabetic cardiomyopathy via the PPAR α pathway. *Aging Cell* 2018;17:e12763.
- 191 **Islam SMT et al.** Peroxisomal footprint in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Hepatol* 2020;19:466–71.
- 192 **Jiang C et al.** Cyclocarya paliurus Triterpenoids Improve Diabetes-Induced Hepatic Inflammation via the Rho-Kinase-Dependent Pathway. *Front Pharmacol* 2019;10.
- 193 **Xue W et al.** Alkannin Inhibited Hepatic Inflammation in Diabetic Db/Db Mice. *Cell Physiol Biochem* 2018;45:2461–70.
- 194 **Murata T et al.** Therapeutic significance of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, on the established liver fibrosis. *J Surg Res* 2003;114:64–71.
- 195 **Wan S et al.** Ursolic acid reverses liver fibrosis by inhibiting interactive NOX4/ROS and RhoA/ROCK1 signalling pathways. *Aging (Albany NY)* 2020;12:10614–32.
- 196 **Ikeda H et al.** Rho-kinase inhibitor prevents hepatocyte damage in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Am J Physiol Liver Physiol* 2007;293:G911–7.
- 197 **Lu L et al.** Myeloid Notch1 deficiency activates the RhoA/ROCK pathway and aggravates hepatocellular damage in mouse ischemic livers. *Hepatology* 2018;67:1041–55.
- 198 **Jahani V et al.** Rho kinase, a potential target in the treatment of metabolic syndrome. *Biomed Pharmacother* 2018;106:1024–30.

11. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REALIZADAS:

Durante o período de realização do doutorado, o bolsista teve as produções científicas descritas abaixo.

2021:

1. De Carvalho, FG; et al. *Taurine supplementation in conjunction with exercise modulated cytokines and improved subcutaneous white adipose tissue plasticity in obese women. Amino Acids (2021). Fator de Impacto: 3.52.*
2. **Muñoz, VR;** et al. *Exercise Counterbalances Rho/ROCK2 Signaling Impairment in the Skeletal Muscle and Ameliorates Insulin Sensitivity in Obese Mice. Frontiers in Immunology (2021). Fator de Impacto: 7.56.*
3. Da Cruz, KC; et al. *Short-Term Strength Exercise Reduces Hepatic Insulin Resistance in Obese Mice by Reducing PTP1B Content, Regardless of Changes in Body Weight International Journal of Molecular Science (2021). Fator de Impacto: 5.92.*
4. Pinto, AP; et al. *Impact of Different Physical Exercises on the Expression of Autophagy Markers in Mice. International Journal of Molecular Science (2021). Fator de Impacto: 5.92.*
5. Gaspar, RC; Pauli, JR; Shulman, GI; **Muñoz, VR.** *An update on brown adipose tissue biology: a discussion of recent findings. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism (2021). Fator de Impacto: 4.31.*
6. Vieira, RF; **Muñoz, VR;** et al. *Time-restricted feeding combined with aerobic exercise training can prevent weight gain and improve metabolic disorders in mice fed a high-fat diet. Journal of Physiology-London (2021). Fator de Impacto: 5.18.*
7. Minuzzi, LG; et al. *Effects of short-term physical training on the interleukin-15 signalling pathway and glucose tolerance in aged rats (2021). Cytokine. Fator de Impacto: 3.86.*
8. Gaspar, RC; et al. *Acute physical exercise increases PI3K-p110 α protein content in the hypothalamus of obese mice. Journal of Anatomy (2021). Fator de Impacto: 2.61.*
9. De Carvalho, FG; et al. *Taurine supplementation associated with exercise increases mitochondrial activity and fatty acid oxidation gene expression in the subcutaneous white adipose tissue of obese women. Clinical Nutrition (2021). Fator de Impacto: 7.32.*

2020:

10. Gaspar, RC; et al. *Aging is associated with increased TRB3, ER stress, and hepatic glucose production in the liver of rats. Experimental gerontology. (2020). Fator de Impacto: 4.03.*

11. Crisol, BM; et al. NAD⁺ precursor increases aerobic performance in mice. *European Journal of Nutrition*. (2020). **Fator de Impacto: 5.61.**
12. Muñoz, VR; et al. When fasting results in metabolic damage: a matter of gender. *Journal of Physiology-London*. (2020). **Fator de Impacto: 5.18.**
13. Muñoz, VR; et al. Physical exercise increases Rock activity in the skeletal muscle of middle-age rats. *Mechanisms of ageing and development* v. 1, p. 111213 (2020). **Fator de Impacto: 5.43.**
14. Vieira, RFL; et al. Exercise activates AMPK signaling: Impact on glucose uptake in the skeletal muscle in aging. *J Rehab Therapy*. (2020).
15. Lima, RD; et al. Occurrence of overweight in schoolchildren and analysis of agreement between anthropometric methods. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano* (2020).
16. Cezaroni, MG; et al. Analysis of body weight of adults by different indirect methods. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano* (2020).
17. Pereira, RM; et al. Long-term effects of moderate physical exercise during early childhood on insulin sensitivity in rats during adulthood. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte* (2020).
18. de Vicente, LG; et al. Tlr4 participates in the responses of markers of apoptosis, inflammation, and ER stress to different acute exercise intensities in mice hearts. *Life Sciences*. p. 117107 (2020). **Fator de Impacto: 5.03.**
19. Minuzzi, LG; et al. Short-term Resistance Training Increases APPL1 Content in the Liver and the Insulin Sensitivity of Mice Fed a Long-term High-fat Diet. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* (2020). **Fator de Impacto: 2.94.**

2019:

20. Muñoz, VR; et al. Rho-kinase activity is upregulated in the skeletal muscle of aged exercised rats. *Experimental Gerontology* v. 128, p. 110746 (2019). **Fator de Impacto: 4.03.**
21. Gaspar, RC; et al. Acute physical exercise increases APPL1/PI3K signaling in the hypothalamus of lean mice. *Eur. J. Neurosci*. (2019). **Fator de Impacto: 3.38.**
22. Nakandakari, SCBR.*, Muñoz, VR;*, et al. Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain. Behav. Immun*. (2019). **Fator de Impacto: 7.21. * autores contribuiram igualmente.**
23. Minuzzi, LG; et al. Immune-endocrine responses and physical performance of master athletes during the sports season. *J. Cell. Biochem*. (2019). **Fator de Impacto: 4.42.**

24. Minuzzi, LG; et al. Lifelong exercise practice and immunosenescence: Master athletes cytokine response to acute exercise. *Cytokine* (2019). **Fator de Impacto: 3.86.**
25. Gaspar, RC; et al. Acute physical exercise increases leptin-induced hypothalamic extracellular signal-regulated kinase1/2 phosphorylation and thermogenesis of obese mice. *J. Cell. Biochem.* (2019). **Fator de Impacto: 4.42.**
26. Alves, JM; et al. Mapping Research in the Obesity, Adipose Tissue, and MicroRNA Field: A Bibliometric Analysis. *Cells.* v. 8, p. 1581 (2019). **Fator de Impacto: 6.60.**
27. Lehnig, AC; et al. Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. *iScience* (2019). **Fator de Impacto: 5.45.**
28. Marinho, R; et al. Endurance training prevents inflammation and apoptosis in hypothalamic neurons of obese mice. *J. Cell. Physiol.* (2019). **Fator de Impacto: 6.38.**

2018:

29. Muñoz, VR; et al. The Effects of Aging on Rho-Kinase and Insulin Signaling in Skeletal Muscle and White Adipose Tissue of Rats. *Journals Gerontol. Ser. A* (2018). **Fator de Impacto: 6.05.**
30. Gaspar, RC; et al. Acute physical exercise increases the adaptor protein APPL1 in the hypothalamus of obese mice. *Cytokine* (2018). **Fator de Impacto: 3.86.**
31. Canciglieri, PH; et al. The reversal effect of physical exercise on aging-related increases in APPL2 content in skeletal muscle. *Life Sciences.* (2018). **Fator de Impacto: 5.03.**
32. Kuga, GK; et al. Physical training reverses changes in hepatic mitochondrial diameter of Alloxan-induced diabetic rats. *Einstein (São Paulo)* (2018).
33. Muñoz, VR; et al. Exercise decreases CLK2 in the liver of obese mice and prevents hepatic fat accumulation. *J. Cell. Biochem.* (2018). **Fator de Impacto: 4.42.**
34. Muñoz, VR; et al. Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. *J. Cell. Physiol.* (2018). **Fator de Impacto: 6.38.**
35. Kuga, GK; et al. Impaired insulin signaling and spatial learning in middle-aged rats: The role of PTP1B. *Experimental Gerontology.* (2018). **Fator de Impacto: 4.03.**
36. Crisol, BM; et al. The role of physical exercise on Sestrin1 and 2 accumulations in the skeletal muscle of mice. *Life Sciences.* (2018). **Fator de Impacto: 5.03.**
37. Gaspar, RC; et al. Physical training prevent and treat hepatic lipid accumulation induced by fructose-rich diet. *Bioscience Journal.* (2018). **Fator de Impacto: 0.34.**

2017:

38. **Muñoz, VR;** et al. *Physical exercise reduces pyruvate carboxylase (PCB) and contributes to hyperglycemia reduction in obese mice. J. Physiol. Sci. (2017). Fator de Impacto: 2.78.*
39. Rodrigues, BA; et al. *Overexpression of Mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 (MKP-3) reduces FoxO1 phosphorylation in mice hypothalamus. Neurosci. Lett. (2017). Fator de Impacto: 3.04.*
40. Rodrigues, BA*; **Muñoz, VR;***,et al. *Obesity Increases Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-3 Levels in the Hypothalamus of Mice. Front. Cell. Neurosci. (2017). Fator de Impacto: 5.50. * autores contribuíram igualmente.*
41. Gaspar, RC; et al. *High Dosage of Vitamin D Regulates the Energy Metabolism and Increases Insulin Sensitivity, but are Associated with High Levels of Kidney Damage. Drug Dev. Res. (2017). Fator de Impacto: 4.36.*
42. Pereira, RM; et al. *Molecular mechanisms of glucose uptake in skeletal muscle at rest and in response to exercise. Motriz, v. 23, p. 1. (2017). Fator de Impacto: 0.08.*

2016:

43. *Regulation of hepatic TRB3/Akt interaction induced by physical exercise and its effect on the hepatic glucose production in an insulin resistance state. Diabetol. Metab. Syndr. 7, 67 (2015). Fator de Impacto: 3.32.*