



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



RAFAEL DOS SANTOS BRÍCOLA

**Expressão de ABHD5 em tecido adiposo no
envelhecimento e a influência do exercício físico em sua
atividade.**

Limeira
2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



RAFAEL DOS SANTOS BRÍCOLA

Expressão de ABHD5 em tecido adiposo no envelhecimento e a influência do exercício físico em sua atividade.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências do Esporte à Faculdade de
Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de
Campinas.

Orientador(a): Prof. Dr Eduardo Rochete Ropelle.

Limeira
2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

B762e Brícola, Rafael dos Santos, 1998-
Expressão de ABHD5 em tecido adiposo no envelhecimento e a influência do exercício físico em sua atividade / Rafael dos Santos Brícola. – Limeira, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Eduardo Rochete Ropelle.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Lipólise. 2. Envelhecimento. 3. Exercícios físicos. I. Ropelle, Eduardo Rochete, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: ABHD5 expression in adipose tissue in aging and the influence of physical exercise on its activity

Palavras-chave em inglês:

Lipolysis

Aging

Physical Exercises

Titulação: Bacharel em Ciências do Esporte

Banca examinadora:

Bárbara Moreira Crisol

Data de entrega do trabalho definitivo: 26-11-2019

Autor: Rafael dos Santos Brícola

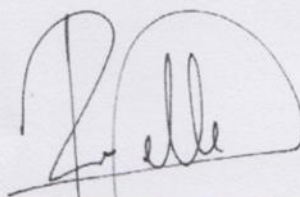
Título: Expressão de ABHD5 em tecido adiposo no envelhecimento e a influência do exercício físico em sua atividade.

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências do Esporte.

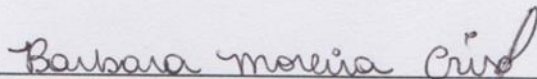
Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 26/11/19.

BANCA EXAMINADORA

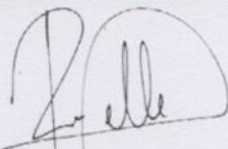


Prof(a). Dr(a). Eduardo Rochete Ropelle – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)



Prof(a). MS – Barbara Moreira Crisol
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada.



Prof(a). Dr(a). Nome Eduardo Rochete Ropelle
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe e meu pai, que são meus maiores orgulhos, os quais me apoiam e me alicerçam em tudo que almejo em minha vida. Sou grato também a todos os familiares e amigos que sempre me motivam a evoluir, persistir e acreditar que sou capaz de realizar meus sonhos. A UNICAMP por me proporcionar os melhores anos da minha vida até agora vividos, bem como todas amizades construídas que me fizeram evoluir academicamente, profissionalmente, socialmente e acima de tudo pessoalmente. Aos Professores responsáveis pelo Laboratório de Biologia Molecular do Exercício (LabMEx), em especial, ao meu orientador Eduardo Ropelle, por todo o suporte e respaldo prestado durante o desenvolvimento do meu projeto. Aos amigos e colegas de laboratório também fica minha sincera gratidão por todo o período de aprendizado, convívio, alegrias e diversão, principalmente aos demais amigos orientados pelo professor Eduardo Ropelle. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo que financiou o presente estudo. Por fim, agradeço acima de tudo à Deus por todas estas graças alcançadas em minha vida.

BRÍCOLA, Rafael dos Santos. Título: Expressão de ABHD5 em tecido adiposo no envelhecimento e a influência do exercício físico em sua atividade. 2019. nº. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências do Esporte) – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2019.

RESUMO

A lipólise é um mecanismo biológico complexo responsável por promover a degradação de moléculas de gordura para obtenção de substrato energético. O processo de envelhecimento é acompanhado pelo aumento do acúmulo de tecido adiposo, que ocorre ao menos em parte, devido a redução da capacidade de ativação da lipólise. Por outro lado, sabidamente o exercício físico é reconhecido como um potente estimulador do processo da lipólise. Recentemente, a proteína ABHD5 (do inglês, *α - β hidrolase domain-contain protein 5*) foi descrita como molécula chave no controle da lipólise, ao passo que a interação entre a ABHD5/ATGL é determinante para a metabolização de triglicerídeos para obtenção de energia. Contudo pouco se conhece sobre a influência do envelhecimento e do exercício físico sobre a expressão/atividade da ABHD5. No presente estudo foram realizadas análises de bioinformática utilizando a base de dados de tecido adiposo branco de camundongos BXD e seres humanos. Também foram utilizados modelos experimentais de envelhecimento e exercício físico em camundongos C57BL/6J. As análises de bioinformática confirmaram que o gene *Abhd5* está positivamente correlacionado com diversos genes relacionados à lipólise no tecido adiposo branco de camundongos BXD e humanos. Curiosamente, foi observada redução dos níveis de *Abhd5* no tecido adiposo subcutâneo ao longo do tempo em indivíduos de 20 a 69 anos. Em modelo experimental, ficou evidenciado que o acúmulo de gordura foi acompanhado por uma redução significativa do conteúdo de proteína ABHD5 no tecido adiposo subcutâneo de camundongos idosos. Por fim, o protocolo HIIT reduziu o acúmulo de tecido adiposo branco nos tecidos subcutâneo, epididimal e retroperitoneal, e aumentou os níveis da proteína ABHD5 no tecido adiposo de camundongos idosos. Tomados em conjunto, nossos resultados demonstraram que o envelhecimento afeta o conteúdo de ABHD5 negativamente e o exercício físico foi capaz de aumentar o conteúdo proteico de ABHD5, contribuindo com a redução da adiposidade durante o envelhecimento.

Palavras-chave: ABHD5, Exercício Físico, Lipólise e Envelhecimento.

BRÍCOLA, Rafael dos Santos. ABHD5 expression in adipose tissue in aging and the influence of physical exercise on its activity. 2019. nºf. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências do Esporte.) – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2019.

ABSTRACT

Lipolysis is a complex biological mechanism responsible for promoting the degradation of fat molecules to obtain energy. The aging process is accompanied by increased accumulation of adipose tissue, which occurs at least in part due to reduced lipolysis activation capacity. On the other hand, exercise is known to be a potent stimulator of the lipolysis. Recently, the protein ABHD5 (α - β hydrolase domain-containing protein 5) has been described as an important molecule to control of lipolysis, whereas the interaction between ABHD5 / ATGL is crucial for metabolizing triglycerides. However, the knowledge about the influence of aging and exercise on ABHD5 expression / activity is not understood. In the present study bioinformatics analyzes were performed using database of white adipose tissue of BXD mice and humans. Experimental models of aging and exercise were also used in C57BL / 6J mice. Bioinformatics analysis confirmed that the *Abhd5* gene is positively correlated with several lipolytic genes in the white adipose tissue of BXD mice and human. Interestingly, a reduction in *Abhd5* levels in subcutaneous adipose tissue over time was observed in individuals aged 20 to 69 years. In an experimental model, it was evidenced that fat accumulation was accompanied by a significant reduction of ABHD5 protein content in subcutaneous adipose tissue of aged mice. Finally, the HIIT protocol reduced the accumulation of white adipose in subcutaneous, epididymal and retroperitoneal tissues and increased the levels of ABHD5 protein in adipose tissue of aged mice. Taken together, our results demonstrated that aging affects ABHD5 content negatively and physical exercise was able to increase ABHD5 protein content, contributing to reduced adiposity during aging.

Keywords: ABHD5, Physical Exercise, Lipolysis and Aging.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ilustração do controle da lipólise pela ABHD5	18
Figura 2	Análise bioinformática em tecido adiposo branco de camundongos BXD e humanos	26
Figura 3	Efeitos do envelhecimento nos níveis de ABHD5	28
Figura 4	Efeitos do exercício físico nos níveis de ABHD5 em camundongos idosos.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Codificação dos genes utilizados para as análises da PCR.	25
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABHD5	A β Hydrolase Domain-Containing 5
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase
HSL	Hormone Sensitive Lipase
pHSL	Phosphorylated Hormone Sensitive Lipase
PLIN	Perilipin
PLIN1	Perilipin 1
HIIT	High Intensity Interval Training
OMS	Organização Mundial da Saúde
AVC	Acidente Vascular Cardíaco
ATP	Adenosina Trifosfato
TAB	Tecido Adiposo Branco
AMP	Adenosina Mono Fosfato
AMPC	Adenosina Mono Fosfato Cíclico
PKA	Proteína Quinase A
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
KO	Nocaute
CGI-58	Comparative Gene Identification 58
TG	Triglicerídeo
DG	Diglicerídeo
MG	Monoglicerídeo
MGL	Lipase de Mono Glicerídeo
CEMIB	Centro de Bioterismo da UNICAMP
DH	Dieta Hiperlipídica

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μ	Micro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	ABHD5 e a lipólise.....	12
1.2	Atividade da ABHD5 no Contexto da lipólise	16
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	OBJETIVO.....	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1	Animais.....	22
4.2	Reagentes e Anticorpos	22
4.3	Protocolo de Exercício Físico.....	22
4.4	Extração do Tecido.....	23
4.5	Análise Proteica por Western Blotting.....	23
4.6	Análise Bioinformática.....	24
4.7	RT – qPCR.....	24
4.8	Triglicérides Sérico.....	25
4.9	Análise Estatística.....	25
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO.....	32
7	CONCLUSÃO.....	34
8	REFERÊNCIAS.....	35
9	APÊNDICES.....	38

1 Introdução

Atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que uma em cada três pessoas esteja acima de seu peso ideal. Sabidamente, o acúmulo excessivo de peso possui estreita relação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, acidentes vasculares cerebrais (AVCs), hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 e distúrbios metabólicos (Tsiloulis e Watt, 2015). O acúmulo de gordura corporal é resultante de um processo multifatorial que inclui característica genéticas, hábitos alimentares, sedentarismo, o processo de envelhecimento, dentre outros (World Health Organization, 2018).

O aumento da adiposidade em decorrência ao envelhecimento se dá, principalmente devido ao comprometimento e depleção de mecanismos metabólicos que ocorrem no organismo humano de maneira generalizada e não diferente disso, o processo lipolítico também acaba sendo comprometido por diversos fatores que regulam e realizam as funções metabólicas do organismo (Camell, Sander *et al.*, 2017).

Mediante tal cenário, pesquisadores procuram cada vez mais aprofundar os conhecimentos acerca dos mecanismos de produção, estoque, e metabolização de gordura. Já é bem elucidado na literatura que a lipólise, que é o mecanismo utilizado para degradação de gordura para obtenção de energia, é fundamental para o combate ao acúmulo de gordura corporal (Zimmermann, Lass *et al.*, 2009). Nesse contexto, estudos atuais revelaram que a proteína $\alpha\beta$ -Hydrolase Containing 5 (ABHD5) é fundamental, seja para a estimulação ou inibição da lipólise (Granneman, Moore, Mottillo *et al.*, 2009; Sanders, Madoux *et al.*, 2015).

1.1 A complexidade da via lipolítica.

O processo de lipólise é um complexo fenômeno biológico preservado em diversas espécies, com objetivo de obtenção de energia a partir da degradação de moléculas de triacilglicerol presentes principalmente no tecido adiposo branco. O equilíbrio entre os processos de síntese e degradação das moléculas de triacilglicerol é fundamental para a manutenção do fenótipo magro (Guilherme, Virbasius *et al.*, 2008; Unger, 2002). Postula-se que problemas relacionados à ativação da lipólise estão diretamente relacionados com o acúmulo excessivo de gordura corporal. Um dos principais exemplos desta condição é observado durante o envelhecimento humano.

Declaradamente, o processo de envelhecimento tem como característica o aumento do acúmulo de tecido adiposo branco (Young e Zechner, 2013). Parte desse acúmulo ocorre devido a redução do processo de lipólise em indivíduos idosos (James, Burns *et al.*, 1971), contudo os mecanismos relacionados à deficiência da ativação da lipólise durante o envelhecimento ainda não são bem entendidos. Por outro lado, notavelmente, o exercício físico é reconhecido como um potente ativador da lipólise, sendo um dos principais agente desencadeador, a liberação de catecolaminas, em especial a adrenalina (Higa, Spinola *et al.*, 2014; Steinberg e Huttunen, 1972). Baseado nos exemplos supracitados, nota-se que a lipólise pode ser modulada positiva ou negativamente em condições fisiológicas distintas, como o envelhecimento e o exercício físico, respectivamente (Higa, Spinola *et al.*, 2014; Schosserer, Grillari *et al.*, 2017). Para melhor elucidar como a lipólise é modulada nessas condições, vejamos a seguir como ocorre em detalhes a lipólise.

Os ácidos graxos são biomoléculas responsáveis pela realização de diversas funções no organismo, são essenciais para a formação do tecido adiposo e suas funções são de suma importância para a homeostase corporal. Dentre suas diversas funções, uma das mais importantes é o fato de que são o substrato energético com maior capacidade de produção de adenosina trifosfato (ATP). No entanto, a alta concentração de ácidos graxos no meio intracelular exerce diversos efeitos deletérios, podendo danificar membranas celulares, organelas e interferindo na transdução de diferentes vias de sinalização. Coletivamente, essas alterações contribuem diretamente para a disfunção tecidual no qual o acúmulo excessivo de ácidos graxos acontece (Schaffer, 2003; Unger, 2002).

Como mecanismo de resposta a estas modulações ocorridas devido ao excesso de ácidos graxos, o organismo se utiliza da esterificação de ácidos graxos com gliceróis, dando origem aos triacilgliceróis, que são depositados em estoques como gotículas lipídicas distribuídas em praticamente todo o corpo. Assim, os triglicerídeos são utilizados como tampão lipídico para combater a acidez tóxica provenientes da alta taxa de concentração de ácidos graxos livres (Schaffer, 2003).

O maior tecido capaz de armazenar ácidos graxos livres é o tecido adiposo branco (TAB) e em momentos em que o corpo necessita catabolizar substratos para a obtenção de energia, como por exemplo em casos de jejum prolongado e exercício físico, hidrolases agem sobre as gotículas de lipídeos e promovem a hidrólise dos triglicerídeos, resultando na liberação de ácidos graxos, sendo este processo

chamado de lipólise. Quando a demanda energética é muito alta, apenas as gotículas de lipídeos não são suficientes, assim, torna-se necessário a utilização de estoques lipídicos maiores, resultando na lipólise de adipócitos (Zimmermann, Lass *et al.*, 2009). De maneira interessante, mecanismos relacionados à deficiência da estimulação da lipólise foram implicados diretamente no excesso de acúmulo de gordura corporal (Camell, Sander *et al.*, 2017), em especial, a deficiência no processo de lipólise é observada durante o processo de envelhecimento, e ao menos em parte, contribui para o aumento da adiposidade em idosos (Camell, Sander *et al.*, 2017; Lönnqvist, Nyberg *et al.*, 1990). Contudo os mecanismos responsáveis pela redução da capacidade de indução da lipólise são apenas parcialmente conhecidos.

Atualmente diferentes lipases são descritas como responsáveis pelo processo de hidrólise dos triglicerídeos. Para que haja a hidrólise adequada de tri e di glicerídeos, é necessária a atuação da ATGL (do inglês, *adipose triglyceride lipase*) e da lipase hormônio-sensível (HSL), o último passo da lipólise é a transformação de diglicerídeos em mono glicerídeo pela proteína lipase de monoglicerídeos, esta proteína é responsável por hidrolisar os monoglicerídeos, culminando na liberação de ácidos graxos livres e glicerol. Hormônios são responsáveis pela ativação das proteínas ATGL e HSL, porém, alguns estudos mostram que monoglicerídeos não possuem grande regulação hormonal, porém, para que haja completa degradação total do lipídeo envolvido na lipólise é necessária sua atividade (Fredrikson, Tornqvist *et al.*, 1986).

Em adipócitos, os ácidos graxos e o glicerol, ao serem liberados provenientes da lipólise, são transportados aos tecidos que apresentam alta demanda energética. O destino dos ácidos graxos é a sua oxidação ou transformação em corpos cetônicos, enquanto o glicerol é destinado a via de gliconeogênese (Fredrikson, Tornqvist *et al.*, 1986). Especificamente em situações de exercício físico, os ácidos graxos são oxidados nas mitocôndrias das células musculares para obtenção de ATP (Bruce, Thrush *et al.*, 2006).

Existem algumas vias de regulação que ativam a quebra dos lipídeos, porém a principal via que ativa a lipólise é iniciada pela interação de catecolaminas com receptores β -adrenérgicos. Os receptores β -adrenérgicos ligados a proteína G ativam a proteína adenilato ciclase, que culmina no aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPc). As AMPc disponíveis se ligam a proteína quinase A (PKA) e estimulam a quebra de gorduras para maior obtenção de energia (Gauthier, Miyoshi

et al., 2008; Rossmeisl, Flachs *et al.*, 2004; Steinberg e Huttunen, 1972). Apesar desta ser a clássica via de ativação da lipólise, também existem outras vias de ativação.

A HSL é responsável pela hidrólise lipídica. No meio intracelular, a HSL pode ser ativada por diferentes quinase, incluindo a PKA, proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Holm, 2003). Além da HSL, outros fatores contribuem para o desencadeamento da lipólise. Nas últimas décadas, alguns estudos demonstraram que a proteína Perilipina exerce função importante na regulação da via de degradação de lipídeos em adipócitos (Greenberg, Egan *et al.*, 1991). Estudos realizados em animais HSL nocaute (KO), mostraram que sua ausência não bloqueia a quebra de moléculas de gordura, porém, há um aumento exacerbado na quantidade de diglicerídeos quando comparados a animais normais. Deste modo foi concluído que HSL possui papel determinante para que ocorra a quebra de diglicerídeos, entretanto, não é a proteína inicial do processo de lipólise (Osuga, Ishibashi *et al.*, 2000; Wang, Laurin *et al.*, 2001; Zimmermann, Haemmerle *et al.*, 2003).

Alguns grupos de estudos passaram a investigar qual seria o ativador inicial da lipólise no meio intracelular. Em 2004, pesquisadores propuseram uma enzima chamada ATGL, phospholipase A2 ξ , ou desnutrina, capaz de iniciar a hidrólise de triglicerídeos (Jenkins, Mancuso *et al.*, 2004; Villena, Roy *et al.*, 2004; Zimmermann, Strauss *et al.*, 2004). De maneira interessante, tal proteína é principalmente expressa em tecido adiposo, no entanto sua expressão também foi observada em outros tecidos, como fibras do tecido muscular cardíaco, muscular esquelético em fibras do tipo I, fígado, entre outros triglicerídeos (Kershaw, Hamm *et al.*, 2006; Villena, Roy *et al.*, 2004; Zimmermann, Strauss *et al.*, 2004). ATGL tem a função de realizar a primeira quebra dos triglicerídeos, culminando na liberação de diglicerídeos e ácidos graxos livres. Esta enzima não demonstra afinidade com outros tipos de substratos como ésteres, o que faz com que sua atividade seja exclusivamente a quebra inicial de triglicerídeos, ao contrário de HSL que realiza a quebra de diglicerídeos e também tem ação em outras vias (Zimmermann, Lass *et al.*, 2009).

Estudos realizados em roedores apresentaram resultados que mostraram que animais ATGLko apresentaram redução de hidrólises em triglicerídeos no tecido adiposo (~ 80%) e desenvolveram maior acúmulo de gordura corporal, culminando na redução da liberação de ácidos graxos proveniente de tecido adiposo, assim, a homeostase energética mostrou-se dificultada em tais animais (Haemmerle,

Zimmermann *et al.*, 2002). Deste modo, fica evidenciado a importância de ATGL na mobilização de substratos para homeostase energética.

Alguns resultados de estudos que compararam animais ATGLko e animais normais, demonstraram que a ativação de ATGL é proveniente da estimulação com isoproterenol e sua inibição parte da ação e da sinalização de insulina. Não se sabe ao certo como os hormônios interferem nas funções enzimáticas de ATGL, no entanto, sabe-se que dois resíduos de serina são responsáveis pela fosforilação de ATGL, sendo eles: serina 404 e serina 428 (Bartz, Zehmer *et al.*, 2007). Paralelamente, a PKA foi descartada da hipótese de ser uma das responsáveis pela ativação de ATGL (Zimmermann, Strauss *et al.*, 2004).

Em situações em que perilipina é fosforilada, a mesma exerce função facilitadora da lipólise (Granneman, Moore *et al.*, 2007). A perilipina auxilia a translocação de HSL do citosol para as gotículas de lipídeos em situações estimuladas pela liberação de hormônios. Para que ocorra esta reação, a perilipina necessita estar fosforilada, o que depende da ação de PKA ou de outras quinases (Granneman, Moore, Krishnamoorthy *et al.*, 2009). Sua fosforilação é necessária para ativação de HSL, e para realizar a translocação de HSL a perilipina não tem necessidade de estar fosforilada, entretanto, a perilipina precisa estar fosforilada para que ocorra a ativação de ATGL (Granneman, Moore, Krishnamoorthy *et al.*, 2009).

1.2 Atividade de ABHD5 no contexto da lipólise

Em 2006, foi descoberto que a atividade de ATGL sofre ação regulatória de um agente coativador, a proteína α/β hydrolase domain containing protein 5 (ABHD5), ou *comparative gene identification 58* (CGI-58). Tal estudo apresentou resultados onde animais com atividade normal desta proteína demonstraram resultados em que ATGL estava 20 vezes mais ativa do que em animais sem atividade de ABHD5 (Lass, Zimmermann *et al.*, 2006; Yen e Farese, 2006). Cabe destacar que embora a relação entre Perilipina e ATGL seja relativamente bem elucidada (Sztalryd, Xu *et al.*, 2003), a atividade da ABHD5 surge como molécula crucial no balanço entre a sinalização entre Perilipina e ATGL (Zimmermann, Strauss *et al.*, 2004). Em situações basais, ABHD5 localiza-se na membrana das gotículas de lipídeos e ligadas a perilipinas. Quando Perilipina sofre fosforilação, sua relação com ABHD5 é modificada. Esta modificação resulta na liberação de ABHD5 para passa a atuar como co-ativador da ATGL, evidenciando a que a atividade de ATGL é dependente da disponibilidade de

ABHD5 (Granneman, Moore *et al.*, 2007; Yen e Farese, 2006). Estudos indicam que para que ocorra a liberação de ABHD5, é necessária a fosforilação em serina 517 de perilipinas em resposta a atividade de PKA (Miyoshi, Perfield *et al.*, 2007). Alguns estudos também relacionaram a atividade de perilipinas com a área de superfície de gotículas de lipídeos onde, quanto menor for estas áreas, mais facilitada é a ação das proteínas lipases, reforçando ainda mais sua importância na via de degradação de lipídeos (Brasaemle, 2007; Subramanian, Rothenberg *et al.*, 2004).

Em tecido não adiposo, como músculo e fígado, onde não existe a presença de perilipinas nas membranas celulares, a relação de ATGL com ABHD5 é mantida, surgindo a hipótese de que existem outras maneiras de se liberar ABHD5 para que a mesma se ligue a ATGL. Alguns estudos apresentaram resultados não totalmente conclusivos acerca da relação da região do terminal-C de ATGL e ABHD5, no entanto, esta região é uma possível reguladora da atividade enzimática de ATGL, através da regulação da ligação de ATGL a gotículas de lipídeos, no entanto tal mecanismo ainda não é bem elucidado, porém pressupõe-se que o mesmo também é responsável pela redução de afinidade entre ATGL e ABHD5 (Zimmermann, Lass *et al.*, 2009).

Em condições basais, em adipócitos e em miócitos, a proteína ABHD5 encontra-se ligada à Perilipina-1 ou Perilipina-5, respectivamente (Young e Zechner, 2013). As Perilipinas são proteínas responsáveis por inibir a atividade de algumas proteínas lipases, como ATGL, por exemplo (Lass, Zimmermann *et al.*, 2006). No entanto, esta atividade inibitória sobre proteínas lipases está estritamente relacionada a sua ligação com ABHD5. Portanto, as Perilipinas possuem ação “sequestradora” sobre ABHD5, a qual possui grande afinidade com ATGL (Gandotra, Lim *et al.*, 2011; Granneman, Moore, Krishnamoorthy *et al.*, 2009; Subramanian, Rothenberg *et al.*, 2004). A atividade das Perilipinas são dependentes da Proteína Quinase A (PKA), ou seja, quando PKA está ativada, ocorre a fosforilação destas proteínas (Gandotra, Lim *et al.*, 2011; Granneman, Moore, Krishnamoorthy *et al.*, 2009; Subramanian, Garcia *et al.*, 2004).

Portanto, de forma didática entende-se que uma vez fosforilada, a Perilipina rompe sua ligação com ABHD5, conseqüentemente, a ABHD5 rapidamente se liga com ATGL e então, aumentando significativamente a atividade lipolítica da ATGL (Lass, Zimmermann *et al.*, 2006), como ilustrado na *figura 1*.

FIGURA 1

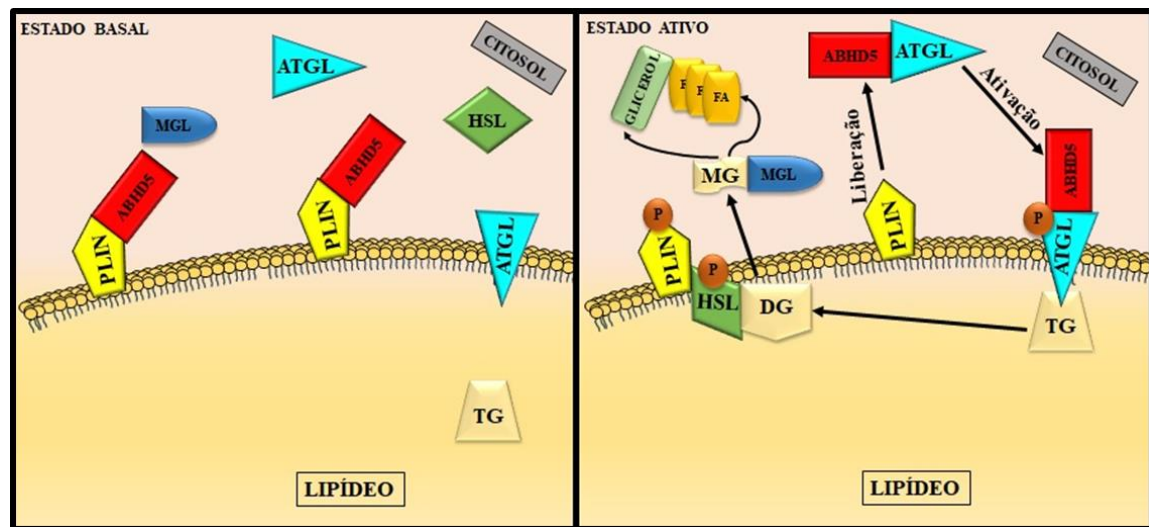


Figura 1 – Lipólise: EM ESTADO BASAL: ABHD5 encontra-se ligada a perilipina, inibindo a ação de ATGL. HSL também não possui expressão de atividade por não estar fosforilada. EM ESTADO ATIVO: Quando fosforilada, ABHD5 tem sua liberação no citosol, onde possui afinidade com ATGL e rapidamente se ligam, fosforilando ATGL e dando início a ação sobre os triglicerídeos. Após ação de ATGL o triglicerídeo é reduzido a diglicerídeo, então HSL se transloca para a membrana, ligando-se a perilipina, onde realiza a quebra de diglicerídeo em monoglicerídeo, após, MGL o quebra, liberando glicerol e três ácidos graxos livres.

Alguns estudos se propuseram a aprofundar os conhecimentos sobre a proteína ABHD5 e encontraram informações importantes a respeito de sua ativação. Sanders, et. al. 2015 demonstraram que a lipólise é regulada por ABHD5, porém, a sua ativação não necessariamente deve prover da fosforilação oriunda de PKA (Sanders, Madoux et al., 2015). Em recentes estudos, pesquisadores propuseram realizar a ativação sintética de ABHD5 (sem atividade de PKA) e quais seriam as respostas da proteína ABHD5 após este tipo de estímulo. Os resultados do estudo demonstraram que a utilização de compostos sintéticos conhecidos como SR-4995 e SR-4559, foram capazes de romper a ligação de ABHD5 com Perilipinas, promovendo a ativação de ATGL, resultando na ativação da lipólise sem necessidade de fosforilação via PKA. Ainda neste mesmo estudo, foi observado que longas cadeias de ácidos graxos, quando ligadas a ABHD5 culminam em sua rápida dissociação à ATGL, inibindo a lipólise (Sanders, Madoux et al., 2015)

Deste modo, os autores concluíram que diferentes estímulos e modulações metabólicas endógenas também podem exercer função reguladora na atividade de ABHD5 e consequentemente na degradação de gordura, o que pode vir a evidenciar possíveis meios de combate a distúrbios metabólicos como a obesidade (Granneman,

Moore, Krishnamoorthy *et al.*, 2009; Lass, Zimmermann *et al.*, 2006; Sanders, Madoux *et al.*, 2015).

Mediante o exposto, o presente projeto propõe-se a analisar dois fenômenos fisiológicos que sabidamente alteram a lipólise, o envelhecimento e o exercício físico. O primeiro gerando falhas na capacidade de estimular a lipólise e o segundo como um potente indutor da lipólise. Contudo, até o presente momento, não existem informações a respeito da atividade da ABHD5 no controle da lipólise durante o envelhecimento e/ou em resposta ao exercício físico.

2 JUSTIFICATIVA

A deficiência na indução do processo de lipólise contribui de maneira significativa para o acúmulo excessivo de gordura corporal, em especial em indivíduos idosos. Por outro lado, o exercício físico é considerado um potente indutor fisiológico do processo de lipólise, contribuindo para redução da adiposidade ou ainda a manutenção do fenótipo magro. Recentemente foi descrito que a ativação da proteína ABHD5 é uma resposta molecular de extrema importância para a manutenção e disponibilidade energética do organismo, exercendo função primordial para a ativação da via da lipólise. Contudo, o papel da ABHD5 sobre o acúmulo de gordura durante o processo de envelhecimento, bem como o efeito do exercício físico sobre a ativação da ABHD5 no tecido adiposo ainda não foram investigados. Portanto o atual projeto buscou abrir novas perspectivas no entendimento do controle da lipólise durante o processo de envelhecimento, além de elucidar a participação do exercício físico sobre a atividade da ABHD5 no tecido adiposo.

3 OBJETIVO

Avaliar o conteúdo proteico de ABHD5, Perilipinas, ATGL e a fosforilação de HSL em tecido adiposo de camundongos jovens e velhos submetidos ou não ao exercício físico.

4 Materiais e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos, com 2 meses de idade para o grupo jovem, para o grupo idoso, foram utilizados camundongos do mesmo modelo experimental com idade de 26 meses, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram previamente pesados e alocados em gaiolas individuais, expostos a ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, com temperatura entre 20°C e 22°C, onde receberam água e ração padrão para roedores (da marca Nuvilab) ad libitum. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da UNICAMP sob o número de protocolo 4773-1 / 2017. O número de animais usados em cada experimento é especificado nas legendas das figuras.

4.2 Reagentes e anticorpos

Os reagentes e os aparelhos utilizados para o gel Sódio Dodecil Sulfato (SDS-PAGE) foram provenientes da Bio-Rad (Richmond, CA). Os compostos Tris Hidroximetil Aminometano (TRIS), Fenilmetil Sulfonil Fluorido (PMSF), Aprotinina e Ditiotreitól (DTT) foram provenientes da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0,2µm) usada foi proveniente da empresa Biorad. Foram utilizados os anticorpos anti ABHD5 (12201-1-AP) da fabricante Proteintech, anti Perilipin XP (9349S), anti HSL(4107S) , pHSL (ser 563) (4139S), anti ATGL (2138S) e β-actin (4967S) provenientes da empresa Cell, pPerilipin (ser497) (#4855) produzido por Vala Sciences.

4.3 Protocolo de exercício físico

Previamente ao período de treinamento, os camundongos foram adaptados ao ergômetro, visando minimizar o estresse do treinamento físico. Durante o período de adaptação, os animais foram submetidos a esteira ergométrica durante 5 dias por 10 minutos. Após a adaptação, os animais foram submetidos à um protocolo de treinamento de alta intensidade (*HIIT*), onde realizaram uma sessão diária de exercício, 5 vezes por semana, com 30 minutos de duração, durante o período de 4 semanas. A sessão foi composta por 10 *bouts* de 2 minutos à 85-90% da P_{máx},

intercalados por 1 minutos de descanso ativo, a 10m/min, com 15° de inclinação da esteira.

4.4 Extração de tecido

Foram extraídas amostras de tecido adiposo mesentérico, subcutâneo, retroperitonal e epididimal que foram posteriormente homogeneizadas em tampão de extração (contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris - pH 7,4, 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4 °C, reagentes da marca Sigma-Aldrich). Após os experimentos, os animais foram sacrificados por aprofundamento de anestesia, seguido de deslocamento cervical. O homogenato foi centrifugado duas vezes a 12.000 RPM por 40 minutos. A concentração de proteína na porção infranadante da amostra foi determinada usando o método do ácido bicinconínico (Walker, 1994). O ensaio de ácido bicinconínico (BCA) para quantificação de proteínas foi de acordo com o protocolo BT-básico de proteína e peptídeo encontrado em: Walker JM (ed) Humana Press. Totowa, NJ, pp. 5-8). O tampão Laemmli foi então adicionado a cada uma das amostras, depois fervido por 5 minutos e armazenado a 80°C. Após as experiências, os animais foram sacrificados por anestesia profunda, seguida de deslocamento cervical.

4.5 Análise proteica por Western blotting.

As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970) contendo DTT 100 mM (Sigma-Aldrich) e aquecidas em água fervente por 5 minutos. Em seguida, foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 6%) no aparelho para minigel (Mini-Protean®). Foi utilizado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se cubas de eletroforese da empresa Bio-Rad por aproximadamente 2 horas, a 120 volts, como descrito por Towbin et al. (Towbin, Staehelin *et al.*, 1979). No tampão, foi acrescido 0,1% de SDS para melhorar a eluição das proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris 10mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%,

reagentes da marca Sigma Aldrich) e posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo primário à 4° C overnight. As membranas foram posteriormente incubadas com 2 µL de anticorpo secundário e, posteriormente incubadas com 2 mL de solução de quimioluminescência (Pierce, CA). A reação do anticorpo secundário com a solução quimioluminescente foi detectada e visualizada com o uso de autorradiografias e/ou fotodocumentador. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do programa Uniscan®.

4.6 Análise Bioinformática

Dados de camundongos - A análise bioinformática foi realizada usando um conjunto de diversos dados genéticos do tecido adiposo subcutâneo de camundongos BXD sob dieta de ração padrão (EPFL / LISP BXD CD WAT WAT Affy MTA 1.0 Nível de gene 1.0 (nível de gene RMA) (Feb16) RMA) e dieta rica em gorduras (EPFL / LISP BXD HFD Subcutânea WAT Affy MTA 1.0 Gene Level (Feb16) RMA) 14 e as características fenotípicas foram obtidas usando porcentagem de perda de peso corporal após o exercício, dieta de ração (6% kCal / gordura Harlan.2918)), machos [%] (EPFL Coorte LISP3)) (Banco de Dados 17605).

Dados humanos - Os transcritos humanos foram obtidos usando os conjuntos de dados (GTExv5 Humano Adiposo Visceral RefSeq (Sep15) RPKM log2) e (GTExv5 Humano Adiposo Subcutâneo RefSeq (Sep15) RPKM log2). Os indivíduos foram separados por idade usando Cofactor, metadados: Age of Individual [década] _Pubmed ID: 2595400115.

O banco de dados de murinos e humanos pode ser acessado no site da GeneNetwork (<http://www.genenetwork.org>). O gráfico de interação, a análise de dois fatores e os gráficos de correlação (Pearson e Spearman) foram construídos usando o Prism GraphPad 7.0® e editados no Corel Draw x7. Os gráficos de heatmap foram obtidos usando o software Gene-E®.

4.7 RT – qPCR

O RNA total foi isolado usando o reagente TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). Uma quantidade de 3 µg de RNA total foi usada como modelo para a síntese de cDNA usando kits de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). As *PCRs real time* foram realizadas usando 300 ng de cDNA e 0,3 µM de iniciadores Abhd5, Atgl e Ywhaz (Tabela 1) e SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Os parâmetros de

ciclagem foram: 10 min a 95 ° C, seguidos de quarenta e 15 s ciclos a 95 ° C, 60 s a 60 ° C. O conteúdo relativo de mRNA foi determinado após normalização com β 2M usando o método $\Delta\Delta C_t$. Cada conjunto de iniciadores foi concebido para reconhecer regiões únicas de sequências de genes. Os iniciadores supracitados estão com suas sequencias descritas a seguir:

Gene	Forward	Reverse
Abhd5	<i>TTTGCCCTCCTCCCTAGCTGGG</i>	<i>TCACCACAGGCAGCTGCAGAACTC</i>
Atgl	<i>AACACCAGCATCCAGTTCAA</i>	<i>GGTTCAGTAGGCCATTCTC</i>
Ywhaz	<i>GAACTCCCCAGAGAAAGCCT</i>	<i>CCGATGTCCACAATGTCAAGT</i>

Tabela 1: Codificação dos genes utilizados para as análises da PCR.

4.8 Triglicérides Sérico

Após o exercício agudo, os triglicerídes séricos foram medidos por kits comerciais da marca LaborLab (Guarulhos, SP) e as análises foram realizadas de acordo com as instruções de fabricação. após a realização do exercício agudo, as análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. Os resultados dos “Western blots ou imunoblots” estão apresentados como comparações diretas das bandas proteicas nas autorradiografias, as quais foram quantificadas através de densitometria usando o programa Uniscan. Os dados foram analisados através do teste *t* - *Student* ou análise de variância (ANOVA), seguida por análise de significância (Bonferroni), quando apropriado, para comparação dos grupos experimentais. A significância estatística adotada é de $p < 0,05$. O processamento e análise dos dados foi feito com o auxílio do software computacional GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

5 Resultados

5.1 *Abhd5* está relacionada ao processo lipolítico no tecido adiposo de animais e humanos

Para explorar a atividade lipolítica de ABHD5, inicialmente, realizamos análises bioinformáticas provenientes de um grande painel de linhagens isogênicas de camundongos BXD. A base de dados BXD tem sido amplamente utilizada para avaliar padrões de variabilidade genética, variações fenotípicas e distúrbios metabólicos complexos em estudos com murinos (Andreux, Williams *et al.*, 2012; Williams, Wu *et al.*, 2016) . Usando transcritos do tecido adiposo subcutâneo de 42 linhagens de animais BXD, nós encontramos correlações positivas entre *Abhd5* e muitos outros genes relacionados a lipólise e não encontramos correlação entre *Abhd5* e genes envolvidos na adipogênese, como demonstrado no gráfico de interação (Figura 2A) e na análise de Pearson (Figura 2B). O mesmo padrão foi encontrado em animais alimentados com dieta rica em gordura (Figura suplementar S1A e S1B). Resultados similares também foram encontrados em tecido adiposo visceral de humanos (n=234), como demonstrado na análise de Pearson e no gráfico de dois fatores (Figura 2C e 2D).

Em seguida, realizamos a avaliação de genes lipolíticos de 10 indivíduos com níveis mais baixos (azul) e 10 indivíduos com níveis mais altos (vermelhos) de mRNA de *Abhd5* no omento visceral (Figura 1E) e tecido adiposo subcutâneo (Figura 1G). O mapa de calor mostra claramente que indivíduos com baixos níveis de mRNA de *Abhd5* no omento visceral (Figura 1F) e subcutâneo (Figura 1H) apresentaram baixos níveis de genes relacionados à lipólise e altos níveis de genes relacionados à lipogênese. Por outro lado, indivíduos com níveis mais altos de mRNA de *Abhd5* no omento visceral e nos tecidos subcutâneos apresentaram níveis mais altos de genes relacionados à lipólise e baixos níveis de genes relacionados à adipogênese (Figura 1F e H). Esses dados iniciais confirmaram que o ABHD5 está fortemente associado à lipólise no tecido adiposo branco de camundongos e humanos.

Figura 2

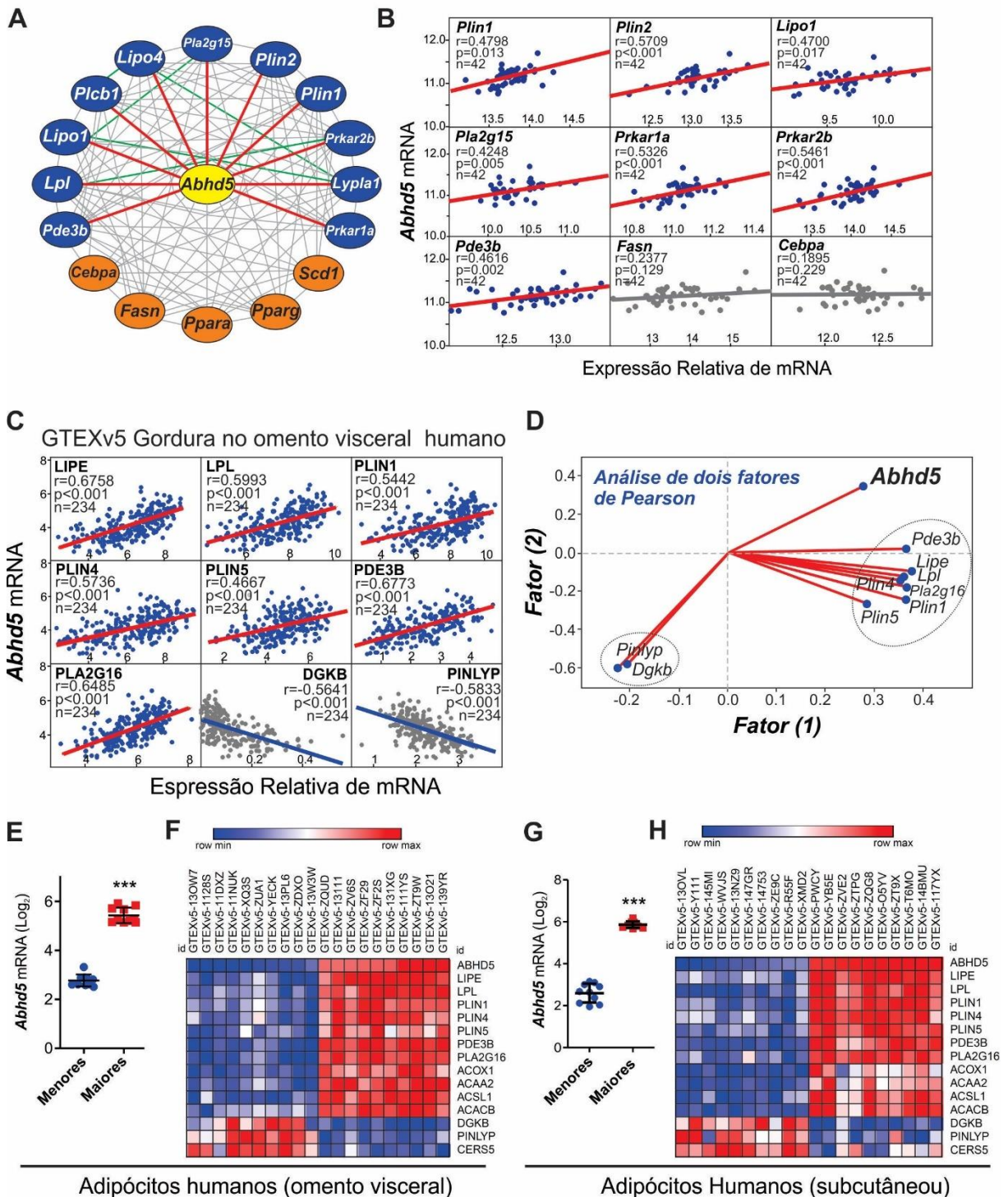


Figura 2. Análise bioinformática. **A.** Análise de interação genica no tecido adiposo subcutâneo de camundongos BXD. Linhas vermelhas indicam correlação positiva ($r > 0,4$ e $p < 0,01$). As linhas verdes indicam correlação positiva ($r > 0,7$ e $p < 0,001$). Os genes relacionados à lipólise são destacados em azul e os genes relacionados à adipogênese em laranja. **B.** Correlações múltiplas de Pearson usando o banco de dados de tecido adiposo de camundongos BXD ($n = 42$). Linhas vermelhas indicam correlação positiva e linhas cinza indicam nenhuma correlação. **C.** Correlações múltiplas de Pearson usando o banco de dados de tecido adiposo de humanos GTEXv5 ($n = 234$). **D.** Análise do gráfico de carga fatorial no omento visceral adiposo de humanos ($n =$

234). **E.** Indivíduos com níveis mais baixos (azul) e mais altos de mRNA de *Abhd5* no omento visceral, teste *t - Student*, *** $p < 0,001$ vs menores ($n = 10$). **F.** Mapa de calor usando os indivíduos da figura E. e genes lipolíticos correlacionados com ABHD5. **G.** Indivíduos com níveis mais baixos (azul) e mais altos de mRNA de *Abhd5* no tecido subcutâneo, teste *t - Student*, *** $p < 0,001$ vs menores ($n = 10$). **H.** Mapa de calor usando os indivíduos da figura G.

Redução de ABHD5 em indivíduos envelhecidos.

Posteriormente, estratificamos o conjunto de dados humano pela idade. Não foi encontrada diferença nos níveis de mRNA de *Abhd5* no omento visceral adiposo em indivíduos entre 20 e 69 anos (Figura 2A). No entanto, encontramos uma regulação negativa significativa dos níveis de mRNA de *Abhd5* em indivíduos após 50 anos no tecido adiposo subcutâneo, quando comparados a indivíduos entre 20 e 29 anos (Figura 2B).

Para confirmar os resultados encontrados, avaliamos o conteúdo proteico de ABHD5 no tecido adiposo em camundongos envelhecidos. Como esperado, os camundongos C57BL/6J idosos possuíam maior massa corporal (Figura 3C) e apresentaram altos níveis de massa de gordura, em particular no tecido adiposo subcutâneo e retroperitoneal (Figura 3D). As análises de Western blot confirmaram que o envelhecimento reduz o conteúdo proteico de ABHD5 em camundongos velhos, quando comparado ao grupo jovem (Figura 3D). Os animais idosos também exibiram baixos níveis de fosforilação de HSL e conteúdo proteico de Perilipina no tecido adiposo subcutâneo (Figura 3D). Tais dados demonstraram que o envelhecimento reduz ABHD5 nos níveis de mRNA e de conteúdo proteico no tecido adiposo de humanos e camundongos, respectivamente.

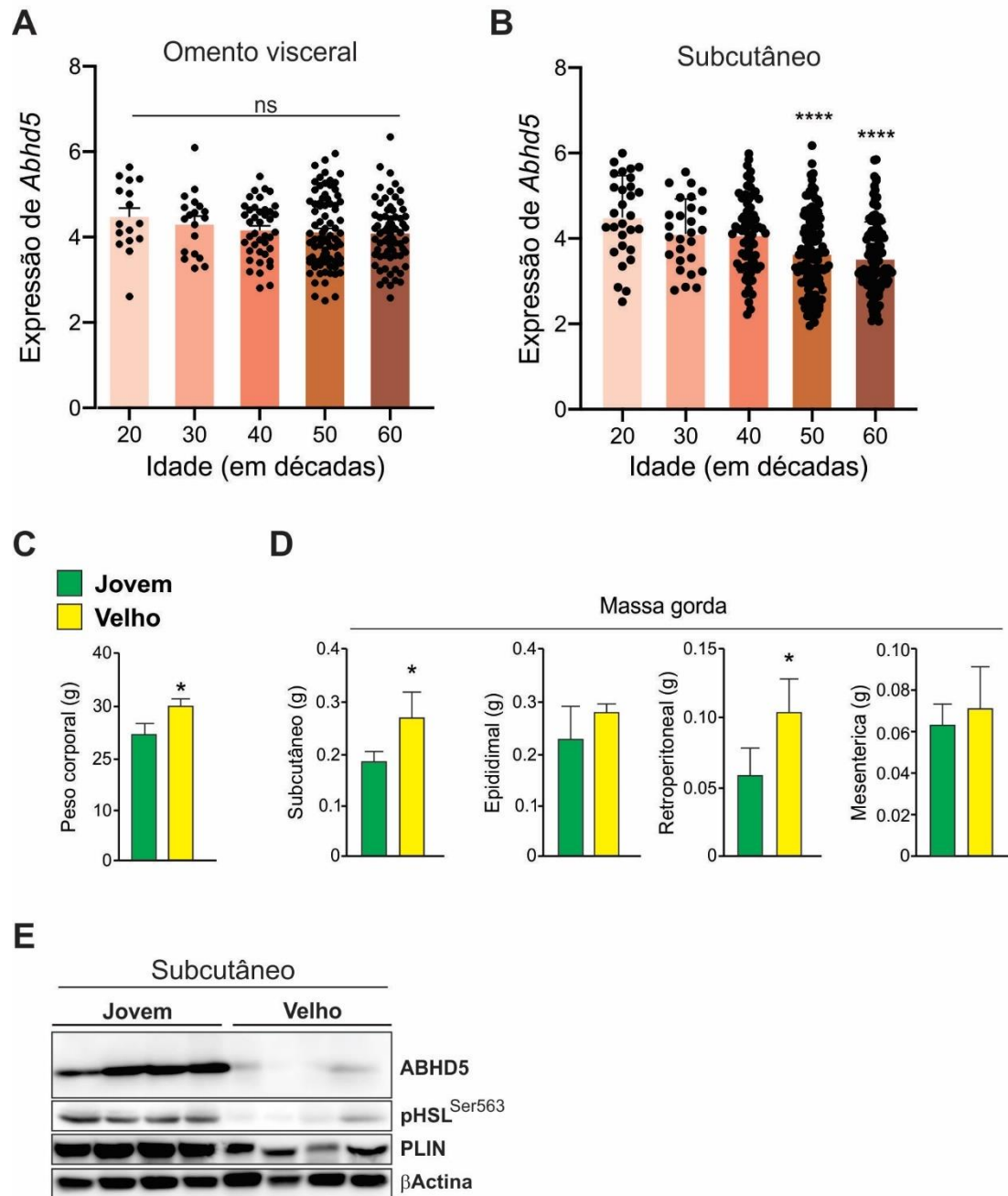
Figura 3

Figura 3. Efeitos do envelhecimento nos níveis de ABHD5. **A.** Níveis de mRNA de *Abhd5* no tecido adiposo visceral de humanos separados por idade ($n = 16-85$ por grupo). **B.** Níveis de mRNA de *Abhd5* no tecido adiposo subcutâneo em humanos separados por idade. Anova One Way. **** $p < 0,0001$ vs 20 anos. ($n = 27-123$ por grupo). **C.** Peso corporal total de camundongos C57BL/6J ($n = 5$). **D.** Peso de massa gorda ($n = 5$). Teste *t* - Student, * $p < 0,05$ vs grupo Jovem. **E.** Western blot do tecido adiposo subcutâneo de camundongos C57BL/6J ($n = 4$).

O aumento do conteúdo proteico de ABHD5 em animais idosos estimulado pelo exercício físico.

Uma vez que o exercício físico estimula a lipólise no tecido adiposo, procuramos determinar o efeito do Treinamento Intervalado de Alta Intensidade (HIIT) sobre a expressão/atividade de ABHD5 no tecido adiposo de camundongos idosos. Inicialmente, avaliamos o efeito de uma única sessão de HIIT em ABHD5 no tecido adiposo. Curiosamente, os altos níveis de triglicerídeos séricos observados em resposta à sessão aguda de HIIT (Figura Supl. S2A) foram acompanhados por altos níveis de mRNA de *Abhd5* e *Atgl* no tecido adiposo subcutâneo de camundongos utilizados como controle (Figuras Supl. S2B e S2C). Com base nessas descobertas, elaboramos a hipótese que, de maneira crônica, o HIIT poderia restaurar os níveis proteicos de ABHD5 no tecido adiposo de camundongos idosos.

Assim, submetemos camundongos idosos ao HIIT por 4 semanas. No final do protocolo, não foi encontrada diferença no peso corporal total dos animais treinados quando comparados a animais controle (Figura 4A). No entanto, camundongos idosos apresentaram níveis mais baixos de depósitos nos tecidos de gordura subcutâneo, epididimal e retroperitoneal após o treinamento físico (Figura 4B). Curiosamente, o treinamento físico aumentou o conteúdo proteico de ABHD5 no tecido adiposo subcutâneo de camundongos idosos (Figura 4B). Foram encontrados altos níveis de outras proteínas lipolíticas, incluindo a fosforilação de HSL e Perilipina e o conteúdo proteico de ATGL em camundongos idosos após o período de treinamento (Figura 4B). De acordo com nossos achados experimentais, o banco de dados de camundongos BXD mostrou uma correlação positiva entre os níveis de mRNA de *Abhd5* no tecido subcutâneo e a perda de peso corporal em resposta ao exercício voluntário (Figura 4C), conforme descrito anteriormente (Williams, Wu *et al.*, 2016). Juntos, esses dados demonstram que o exercício modula ABHD5 no tecido adiposo e pode contribuir para a lipólise e redução do acúmulo de gordura durante o envelhecimento.

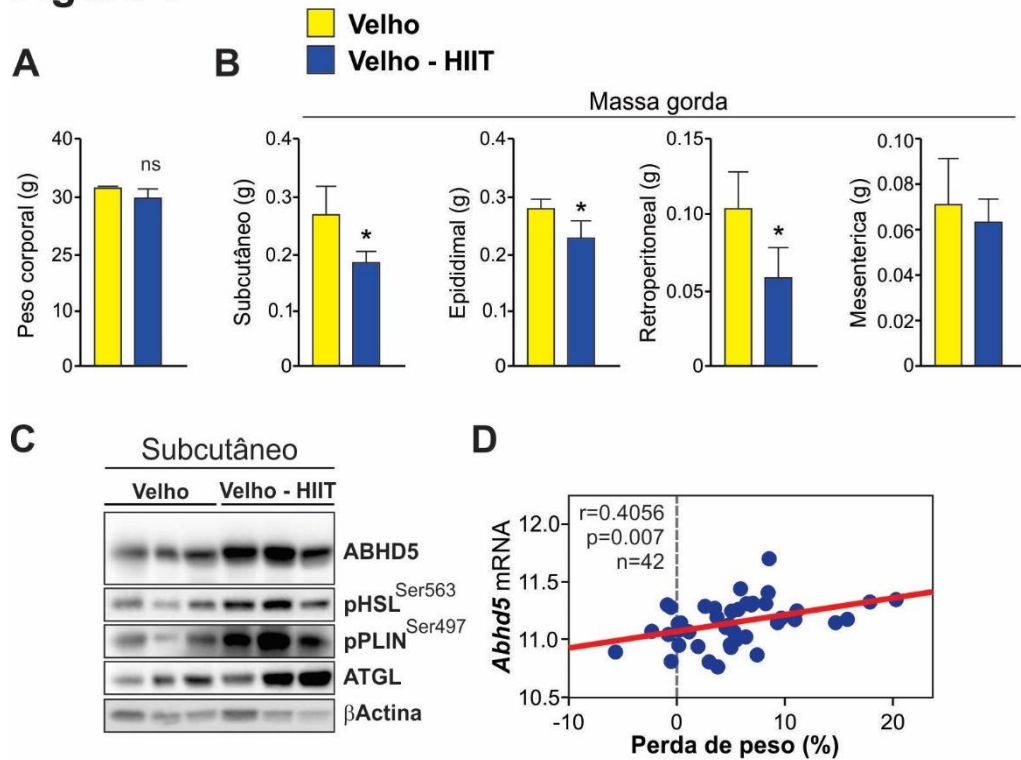
Figura 4

Figura 4. Efeitos do exercício físico nos níveis de ABHD5 em camundongos idosos. **A.** Peso corporal total de camundongos C57BL/6J ($n = 5$). **B.** Peso de massa gorda ($n = 5$). Teste t - Student, * $p < 0,05$ vs grupo de idosos. **C.** Western blot do tecido adiposo subcutâneo de camundongos C57BL/6J ($n = 3$). **D.** Correlação múltipla de Pearson entre o mRNA de Abhd5 no tecido subcutâneo e a porcentagem de perda de peso corporal após duas semanas de exercício voluntário em camundongos BXD ($n = 42$).

6 Discussão

O aumento do peso corporal durante o envelhecimento está relacionado a um processo multifatorial que inclui fatores genéticos, alterações hormonais, disfunções mitocondriais, inatividade física, e outros (Organization, 2017; Zimmermann, Lass *et al.*, 2009). No Contexto do metabolismo lipídico, ABHD5 se apresenta como proteína fundamental na regulação da lipólise (Granneman, Moore, Mottillo *et al.*, 2009; Sanders, Madoux *et al.*, 2015). Assim, buscamos investigar a atividade de ABHD5 no processo de envelhecimento, bem como analisar se o exercício físico é capaz de interferir em sua atividade/expressão na fase idosa. Nosso estudo demonstrou que o envelhecimento reduziu os níveis de ABHD5 no tecido subcutâneo de camundongos e humanos. Em adição, demonstramos que o treinamento físico foi capaz de aumentar os níveis de ABHD5 em tecido adiposo subcutâneo de camundongos idosos.

A lipólise é um importante mecanismo fisiológico que disponibiliza substrato energético através da hidrólise de triglicerídeos. Entretanto, estudos já demonstraram que o processo de envelhecimento afeta a atividade da via da lipólise. A redução da atividade lipolítica está claramente associada ao acúmulo de gordura visceral e disfunções metabólicas. Contudo, os mecanismos afetados neste processo ainda não estão profundamente elucidados. Somado a isto, foi proposto que a deficiência lipolítica está associada a atividade/expressão desregulada do receptor beta-adrenérgico 3 no tecido adiposo de camundongos idosos (Kumar, Moore *et al.*, 1999). Recentemente, Camel e colaboradores demonstraram que a atividade de macrófagos no tecido adiposo reduz a biodisponibilidade de noradrenalina através do mecanismo dependente de NLRP3, que culmina na redução da lipólise em camundongos idosos (Camell, Sander *et al.*, 2017; Greenberg, Egan *et al.*, 1991). No estudo atual, propomos que a proteína ABHD5 pode estar envolvida no comprometimento da capacidade lipolítica no tecido adiposo subcutâneo durante o envelhecimento. Nós encontramos baixa expressão da proteína ABHD5 e também de seu RNA mensageiro no tecido adiposo, porém, os mecanismos responsáveis por reduzir ABHD5 no tecido adiposo subcutâneo no processo de envelhecimento são desconhecidos e carecem de estudos futuros aprofundados neste tema.

Usando uma robusta base de dados de humanos, nossas análises transcritômicas confirmaram associação consistente entre *Abhd5* e muitos genes envolvidos na atividade lipolítica. Na base de dados de camundongos BXD, encontramos correlação

positiva entre *Abhd5* e genes lipolíticos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica ou padrão. Resultados similares foram observados em humanos. Notavelmente, a separação por idade dos dados de humanos, apresentaram redução dos níveis de mRNA de *Abhd5* no tecido adiposo subcutâneo após os 50 anos de idade em indivíduos humanos, o que também ocorreu em camundongos.

O mecanismo pelo qual ABHD5 estimula a lipólise está relacionado a sua interação com ATGL. Inversamente, a atividade inibitória de ABHD5 sobre a via lipolítica acontece devido a associação entre ABHD5 e PLIN1. No presente estudo, não avaliamos as associações entre ABHD5/PLIN1 e ABHD5/ATGL, mas a severa redução do conteúdo proteico de ABHD5 encontrada em camundongos envelhecidos sugerem que provavelmente, a ligação ABHD5/ATGL é reduzida, contribuindo para o comprometimento da atividade da via lipolítica.

Ao oposto disso, o exercício físico é utilizado como agente combatente do acúmulo de gordura corporal (Steinberg e Huttunen, 1972; Tchkonja, Morbeck *et al.*, 2010). A atividade física estimula a liberação de catecolaminas que levam a mobilização de ácidos graxos através da lipólise. Nesse contexto, estudos contemporâneos mostraram que o exercício intervalado de alta intensidade (HIIT) estimula a mobilização de ácidos graxos e contribui para a redução de gordura corporal (Andreato, Esteves *et al.*, 2019; Batacan, Duncan *et al.*, 2017; Davenport, Meah *et al.*, 2018; Liu, Zhu *et al.*, 2019). Neste trabalho, submetemos os animais envelhecidos ao protocolo de treinamento HIIT. Inicialmente, não encontramos diferença significativa no peso corporal dos animais após um treinamento realizados durante 4 semanas, entretanto, observamos uma redução significativa no estoque de diferentes tecidos de gordura, sugerindo que o exercício físico é capaz de induzir a lipólise em animais idosos. De maneira aguda, o exercício HIIT aumentou o RNA mensageiro de *Abhd5* no tecido adiposo subcutâneo de camundongos jovens, demonstrando que a atividade física estimula a transcrição de *Abhd5* no tecido adiposo. Cronicamente, o HIIT aumentou o conteúdo proteico de ABHD5 em camundongos idosos. Além disso, nós encontramos níveis aumentados de outras proteínas marcadoras da lipólise, incluindo pHSL, pPLIN e ATGL no tecido adiposo subcutâneo de animais envelhecidos.

7 Conclusão

Tomados em conjunto, nossos resultados demonstraram que o envelhecimento diminuiu os níveis de ABHD5 no tecido adiposo subcutâneo de camundongos idosos e seres humanos. Além disso, descobrimos que o exercício físico de alta intensidade é capaz de aumentar a expressão/atividade de ABHD5 e diminuir os estoques de gordura. Assim, nosso estudo fornece evidências substanciais de que a redução de ABHD5 está envolvida no comprometimento da atividade lipolítica em indivíduos idosos e o exercício físico é capaz de reverter este processo no envelhecimento.

REFERÊNCIAS

- ANDREATO, L. V. et al. The influence of high-intensity interval training on anthropometric variables of adults with overweight or obesity: a systematic review and network meta-analysis. **Obes Rev**, v. 20, n. 1, p. 142-155, 01 2019.
- ANDREUX, P. A. et al. Systems genetics of metabolism: the use of the BXD murine reference panel for multiscalar integration of traits. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1287-99, Sep 2012.
- BARTZ, R. et al. Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. **J Proteome Res**, v. 6, n. 8, p. 3256-65, Aug 2007.
- BATACAN, R. B. et al. Effects of high-intensity interval training on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. **Br J Sports Med**, v. 51, n. 6, p. 494-503, Mar 2017.
- BRASAEMLE, D. L. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. **J Lipid Res**, v. 48, n. 12, p. 2547-59, Dec 2007.
- BRUCE, C. R. et al. Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 1, p. E99-E107, Jul 2006.
- CAMELL, C. D. et al. Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. **Nature**, v. 550, n. 7674, p. 119-123, 10 2017.
- DAVENPORT, M. H. et al. Impact of prenatal exercise on neonatal and childhood outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Br J Sports Med**, v. 52, n. 21, p. 1386-1396, Nov 2018.
- FREDRIKSON, G.; TORNQVIST, H.; BELFRAGE, P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. **Biochim Biophys Acta**, v. 876, n. 2, p. 288-93, Apr 1986.
- GANDOTRA, S. et al. Human frame shift mutations affecting the carboxyl terminus of perilipin increase lipolysis by failing to sequester the adipose triglyceride lipase (ATGL) coactivator AB-hydrolase-containing 5 (ABHD5). **J Biol Chem**, v. 286, n. 40, p. 34998-5006, Oct 2011.
- GAUTHIER, M. S. et al. AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. **J Biol Chem**, v. 283, n. 24, p. 16514-24, Jun 2008.
- GRANNEMAN, J. G. et al. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 282, n. 8, p. 5726-35, Feb 2007.
- GRANNEMAN, J. G. et al. Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). **J Biol Chem**, v. 284, n. 50, p. 34538-44, Dec 2009.
- GRANNEMAN, J. G. et al. Functional interactions between Mldp (LSDP5) and Abhd5 in the control of intracellular lipid accumulation. **J Biol Chem**, v. 284, n. 5, p. 3049-57, Jan 2009.
- GREENBERG, A. S. et al. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. **J Biol Chem**, v. 266, n. 17, p. 11341-6, Jun 1991.
- GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 367-77, May 2008.
- HAEMMERLE, G. et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. **J Biol Chem**, v. 277, n. 7, p. 4806-15, Feb 2002.
- HIGA, T. S. et al. Remodeling of white adipose tissue metabolism by physical training prevents insulin resistance. **Life Sci**, v. 103, n. 1, p. 41-8, May 2014.
- HOLM, C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. Pt 6, p. 1120-4, Dec 2003.
- JAMES, R. C.; BURNS, T. W.; CHASE, G. R. Lipolysis of human adipose tissue cells: influence of donor factors. **J Lab Clin Med**, v. 77, n. 2, p. 254-66, Feb 1971.

- JENKINS, C. M. et al. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. **J Biol Chem**, v. 279, n. 47, p. 48968-75, Nov 2004.
- KERSHAW, E. E. et al. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. **Diabetes**, v. 55, n. 1, p. 148-57, Jan 2006.
- KUMAR, M. V.; MOORE, R. L.; SCARPACE, P. J. Beta3-adrenergic regulation of leptin, food intake, and adiposity is impaired with age. **Pflugers Arch**, v. 438, n. 5, p. 681-8, Oct 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.
- LASS, A. et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. **Cell Metab**, v. 3, n. 5, p. 309-19, May 2006.
- LIU, J. X. et al. Effectiveness of high-intensity interval training on glycemic control and cardiorespiratory fitness in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Aging Clin Exp Res**, v. 31, n. 5, p. 575-593, May 2019.
- LÖNNQVIST, F. et al. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue of the elderly. **J Clin Invest**, v. 85, n. 5, p. 1614-21, May 1990.
- MIYOSHI, H. et al. Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 282, n. 2, p. 996-1002, Jan 2007.
- ORGANIZATION, W. H. Obesity and overweight. 2017. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >.
- OSUGA, J. et al. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 2, p. 787-92, Jan 2000.
- ROSSMEISL, M. et al. Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28 Suppl 4, p. S38-44, Dec 2004.
- SANDERS, M. A. et al. Endogenous and Synthetic ABHD5 Ligands Regulate ABHD5-Perilipin Interactions and Lipolysis in Fat and Muscle. **Cell Metab**, v. 22, n. 5, p. 851-60, Nov 2015.
- SCHAFFER, J. E. Lipotoxicity: when tissues overeat. **Curr Opin Lipidol**, v. 14, n. 3, p. 281-7, Jun 2003.
- SCHOSSERER, M. et al. Age-Induced Changes in White, Brite, and Brown Adipose Depots: A Mini-Review. **Gerontology**, Dec 2017.
- STEINBERG, D.; HUTTUNEN, J. K. The role of cyclic AMP in activation of hormone-sensitive lipase of adipose tissue. **Adv Cyclic Nucleotide Res**, v. 1, p. 47-62, 1972.
- SUBRAMANIAN, V. et al. Hydrophobic sequences target and anchor perilipin A to lipid droplets. **J Lipid Res**, v. 45, n. 11, p. 1983-91, Nov 2004.
- SUBRAMANIAN, V. et al. Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. **J Biol Chem**, v. 279, n. 40, p. 42062-71, Oct 2004.
- SZTALRYD, C. et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. **J Cell Biol**, v. 161, n. 6, p. 1093-103, Jun 2003.
- TCHKONIA, T. et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. **Aging Cell**, v. 9, n. 5, p. 667-84, Oct 2010.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979.
- TSILOULIS, T.; WATT, M. J. Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 135, p. 175-201, 2015.
- UNGER, R. H. Lipotoxic diseases. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 319-36, 2002.
- VILLENA, J. A. et al. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. **J Biol Chem**, v. 279, n. 45, p. 47066-75, Nov 2004.
- WALKER, J. M. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. **Methods Mol Biol**, v. 32, p. 5-8, 1994.
- WANG, S. P. et al. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. **Obes Res**, v. 9, n. 2, p. 119-28, Feb 2001.

- WILLIAMS, E. G. et al. Systems proteomics of liver mitochondria function. **Science**, v. 352, n. 6291, p. aad0189, Jun 2016.
- YEN, C. L.; FARESE, R. V. Fat breakdown: a function for CGI-58 (ABHD5) provides a new piece of the puzzle. **Cell Metab**, v. 3, n. 5, p. 305-7, May 2006.
- YOUNG, S. G.; ZECHNER, R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. **Genes Dev**, v. 27, n. 5, p. 459-84, Mar 2013.
- ZIMMERMANN, R. et al. Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. **J Lipid Res**, v. 44, n. 11, p. 2089-99, Nov 2003.
- ZIMMERMANN, R. et al. Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1791, n. 6, p. 494-500, Jun 2009.
- ZIMMERMANN, R. et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. **Science**, v. 306, n. 5700, p. 1383-6, Nov 2004.

APÊNDICE A – FIGURA SUPLEMENTAR 1

Figura Supl. 1

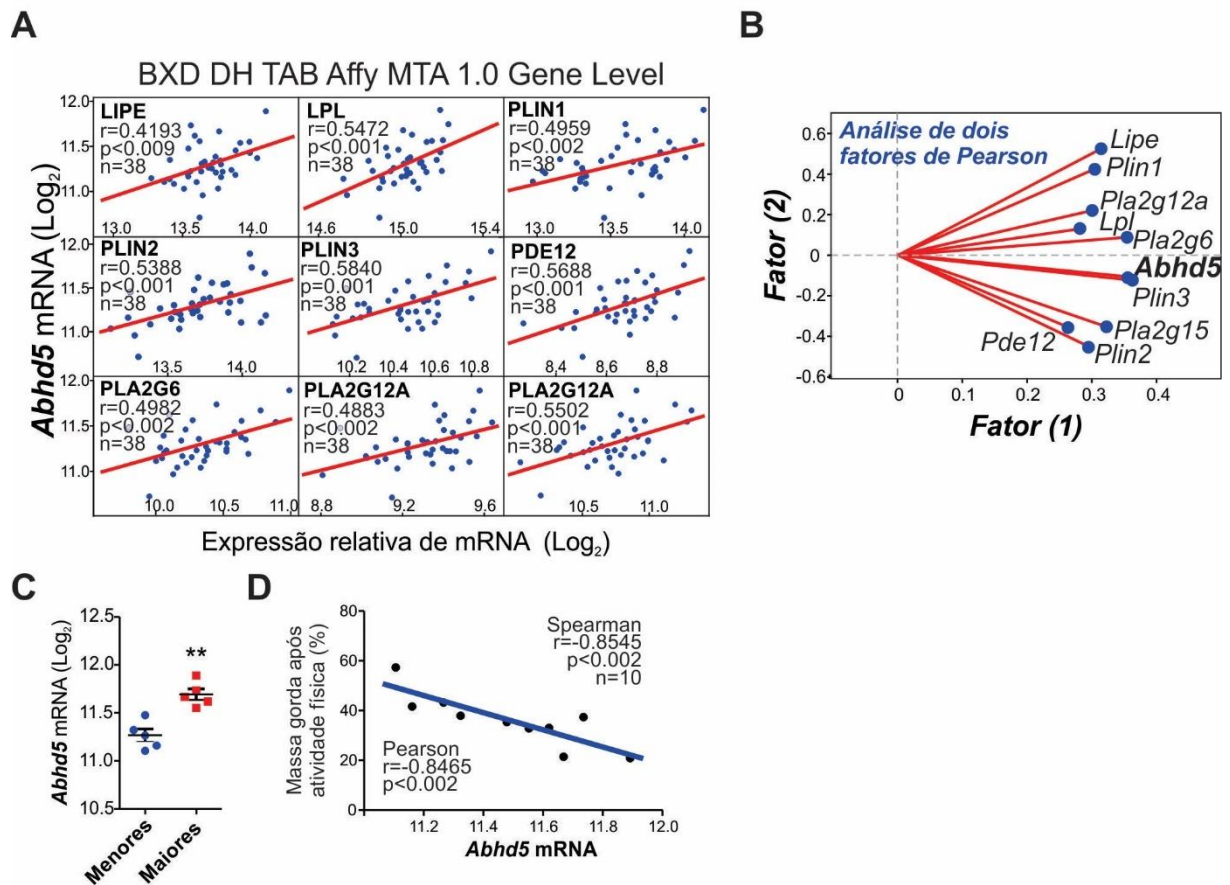


Figura Suplementar S1. Análise bioinformática. A. Correlações múltiplas de Pearson usando tecido adiposo de camundongos BXD alimentados com dieta hiperlipídica ($n = 38$). Linhas vermelhas indicam correlação positiva. **B.** Análise de plotagem de carga fatorial em adiposo de camundongos BXD em dieta hiperlipídica ($n = 38$). **C.** Camundongos BXD obesos com níveis de mRNA *Abhd5* mais baixos (azul) e mais altos no tecido visceral, teste *t-Student*, ** $p < 0,01$ vs Inferior ($n = 5$). **D.** Correlação de Spearman entre o mRNA de *Abhd5* no tecido adiposo e a porcentagem de massa gorda após duas semanas de exercício voluntário em camundongos BXD alimentados com dieta hiperlipídica ($n = 10$).

APÊNDICE B – FIGURA SUPLEMENTAR 2

Figura supl. S2

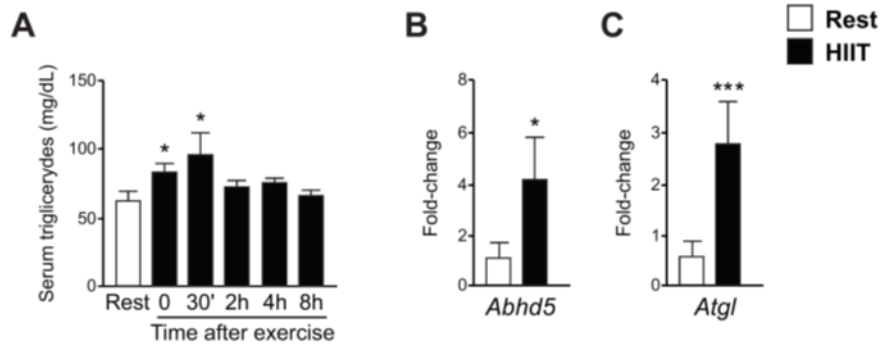


Figura Suplementar S2. A. Triglicerídeos séricos em resposta à sessão aguda de HIIT em camundongos jovens. Anova One-Way. * $p < 0,05$ vs repouso ($n = 5$). **B.** Análise de RT-qPCR no tecido adiposo subcutâneo 8 horas após a sessão HIIT em camundongos jovens. * $p < 0,05$ vs repouso ($n = 5$).