



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



Rafael Calais Gaspar

**PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NA REGULAÇÃO DA PROTEÍNA
NOTCH1 EM CAMUNDONGOS OBESOS: EFEITOS SOBRE A
LIPOGÊNESE E GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA**

LIMEIRA
2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



Rafael Calais Gaspar

**PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO NA REGULAÇÃO DA PROTEÍNA
NOTCH1 EM CAMUNDONGOS OBESOS: EFEITOS SOBRE A
LIPOGÊNESE E GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA**

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 do Esporte.

Orientador: Prof. Dr. José Rodrigo Pauli.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO RAFAEL CALAIS GASPAR, 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

G213p Gaspar, Rafael Calais, 1992-
Papel do exercício físico na regulação da proteína Notch1 em camundongos obesos : efeitos sobre a lipogênese e gliconeogênese hepática / Rafael Calais Gaspar. – Limeira, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: José Rodrigo Pauli.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Exercícios físicos. 2. Obesidade. 3. Fígado. 4. Resistência à insulina. 5. Receptor Notch1. I. Pauli, José Rodrigo, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of physical exercise in the regulation of Notch1 protein in obese mice : effects on hepatic lipogenesis and gluconeogenesis

Palavras-chave em inglês:

Exercise

Obesity

Liver

Insulin resistance

Receptor, Notch1

Área de concentração: Ciências do Esporte

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

Banca examinadora:

José Rodrigo Pauli [Orientador]

Igor Luchini Baptista

Ellen Cristini de Freitas

Carlos Kiyoshi Katashima

Maíra Felonato

Data de defesa: 20-07-2021

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/0000-0002-2208-3527>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2006131447795841>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Rafael Calais Gaspar

Título: Papel do exercício físico na regulação da proteína Notch1 em camundongos obesos: efeitos sobre a lipogênese e gliconeogênese hepática.

Natureza: Tese

Área de Concentração: Ciências do Esporte

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 20 de julho de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Rodrigo Pauli (orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Igor Luchini Baptista (membro)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dra. Ellen Cristini de Freitas (membro externo)
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Carlos Kiyoshi Katashima (membro externo)
Faculdade de Ciências médicas - FCM/Unicamp

Prof. Dra. Maíra Felonato (membro externo)
Fundação Hermínio Ometto

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Wilson Gaspar e Solange Calais,
pelo esforço realizado para a formação de seus filhos.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer à Deus por tudo que Ele tem me proporcionado

Aos meus pais, por toda dedicação e esforço durante todos esses anos para dar o melhor para seus filhos. Com eles aprendi que mesmo quando as coisas não são favoráveis, com fé e persistência tudo se torna possível. Além disso, descobri com eles que não há nada melhor que vivermos em família. Agradeço aos meus irmãos, Guilherme e Gustavo, por todo carinho, confiança, respeito e por tudo que passamos juntos.

Agradeço à minha namorada, Susana, por todo o amor, paciência, compreensão, amizade e ensinamentos, como aprendi com você. Obrigado por me incentivar a ser uma pessoa melhor. Não foi fácil conciliar as tarefas, os horários e principalmente a distância, mas com você tudo se tornou possível.

Ao professor José Rodrigo Pauli. Que privilégio poder ser seu aluno, infelizmente nem todos poderão ter essa sorte. Obrigado pela oportunidade, confiança e por não medir esforços em me ajudar em tudo o que eu precisei até aqui. No decorrer dessa trajetória descobri que além da sua sabedoria acadêmica, que é indiscutível, você é um ser humano fantástico. Com seu jeito, nos aponta o caminho, manifesta sua opinião, aponta nossos erros, mas tudo isso de um jeito sincero e humano, como amigo. Te admiro como profissional, como professor e como pessoa. Serei eternamente grato por tudo e espero um dia retribuir toda essa confiança.

Aos professores Eduardo R. Ropelle, Dennys E. Cintra, Leandro P. de Moura e Adelino S.R. da Silva. Gostaria de agradecer a todos pela incansável luta para sempre aprendermos mais e evoluir os trabalhos desenvolvidos no nosso laboratório. Mais do que isso, por estarem sempre presentes em tudo que nós, alunos, precisamos. Obrigado pelo tempo dedicado a nos ensinar, escutar e pela oportunidade de fazermos

parte desse seleto time. Com certeza, vocês fizeram a diferença na minha formação profissional e pessoal, serei eternamente grato a todos vocês.

Ao professor Fernando Simabuco, Isadora Pavan e ao Luiz Salvino pela colaboração nos experimentos de cultura celular. Obrigado pela confiança e ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos e colegas dos laboratórios LabMEx (Zé Diego, Rodolfo, Vitor, Gabriel, Léo, Paulo, Renan, Luciele, Lucieli, Bárbara, Carlos, Vagner, André, Luciene, Bricola, Lucas, Renata), LabGeN (Susana, Alexandre, Guilherme, Patricia, Marcella, Camilla B., Dátilo, Camila e Thaiane) e ECeBiL (Rodrigo, Chadi, Raphael, Kellen, Thaís e Diego). Muito obrigado a todos que fizeram parte desse trabalho e aos demais colegas que fazem com que o nosso ambiente de trabalho seja mais agradável, divertido e produtivo. Em especial, gostaria de agradecer ao meu parceiro Vitor, por todos esses anos de parceria. Começamos essa caminhada juntos e erramos bastante, mas mantivemos a dedicação e companheirismo, até que as coisas começaram acontecer. Passamos anos trabalhando o dia todo, finais de semana e feriados. Aprendemos muito um com o outro e conquistamos muitas coisas juntos, momentos inesquecíveis. Muito obrigado, Vitor.

Ao Prof. Dr. Gerald Shulman e a toda sua equipe. Agradeço a confiança, oportunidade e por me receberem tão bem durante o período meu período de intercâmbio. Sem dúvida, foi um grande desafio e um momento de muito aprendizado.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2017/20542-3 e 2019/11338-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

EPÍGRAFE

*“Suba o primeiro degrau com fé. Você não tem que ver toda a escada.
Você só precisa dar o primeiro passo”.*

Martin Luther King Jr.

RESUMO

A proteína Notch1 apresenta uma importante função no metabolismo hepático, atuando no controle da produção de glicose e no metabolismo lipídico, impactando diretamente nos danos hepáticos causados pela obesidade, tornando-a um importante alvo de pesquisa. Por outro lado, o exercício físico tem sido sugerido como uma intervenção não farmacológica altamente eficaz no controle dos agravos da obesidade, contudo, os mecanismos atrelados ao exercício não foram totalmente desvendados. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo verificar os efeitos do exercício físico na modulação da proteína Notch1 no tecido hepático de camundongos obesos e sua contribuição no controle da lipogênese e gliconeogênese. Assim, verificou-se que os animais obesos, induzidos por dieta, se mostraram resistentes à insulina e apresentaram aumento no conteúdo proteico e na ativação de Notch1, porém o exercício físico foi capaz de melhorar a homeostase glicêmica, reduzir a ativação de Notch1 hepática, sobretudo a expressão de Presinilina-1, importante na ativação da Notch1. Ainda, observou-se uma redução do conteúdo proteico das proteínas reguladoras da gliconeogênese e da lipogênese hepática nos animais treinados em relação ao grupo obeso sedentário, que também tiveram aumentos na respiração mitocondrial quando comparados aos animais sedentários. Tais achados, foram confirmados por meio da inibição do complexo γ -secretase, em que se observou uma atenuação da tolerância ao piruvato bem como na redução da sinalização da Notch1 no fígado de animais obesos. Paralelamente, notou-se que camundongos obesos B6.V-Lepob/JUnib (ob/ob), apresentaram significativo aumento da ativação da Notch1 e o treinamento aeróbio foi capaz de reduzir o domínio clivado da Nocth1 assim como proteínas chaves controladas por ela. Por fim, verificou-se que a superexpressão da Notch1 e do NICD em células hepáticas, resultou em aumento de enzimas da gliconeogênese e da lipogênese, corroborando com os resultados *in vivo*. Portanto, os resultados encontrados no estudo elucidam novos mecanismos pelo qual o exercício físico atua favorecendo o metabolismo hepático bem como aponta a Notch1 como um potencial alvo terapêutico nos danos associados a obesidade.

Palavras-chave: Treinamento físico; obesidade; fígado; resistência à insulina; Notch1.

ABSTRACT

The Notch1 protein plays an important role in liver metabolism, acting in the control of glucose production and lipid metabolism, directly impacting liver damage caused by obesity, making it an important research target. On the other hand, the physical exercise has been suggested as a highly effective non-pharmacological intervention in the control of obesity disorders, however, the mechanisms linked to it have not been fully unveiled. Therefore, this study aims to verify the effects of physical exercise on the modulation of Notch1 protein in the liver tissue of obese mice and its contribution to the control of lipogenesis and gluconeogenesis. Thus, it was found that obese animals, diet-induced, were resistant to insulin and showed increased Notch1 protein content and activation, but physical exercise was able to improve the glycemic homeostasis, to reduce hepatic Notch1 activation, especially the expression of Presinilin-1, which is important in the activation of Notch1. Furthermore, it was observed a reduction in the protein content of the regulatory proteins of gluconeogenesis and hepatic lipogenesis in trained animals besides increased mitochondrial respiration, compared to sedentary group. Such findings were confirmed through inhibition of the γ -secretase complex, where an attenuation of tolerance to pyruvate was observed, as well as a reduction in Notch1 signaling in the liver of obese animals. Nevertheless, it was noted that obese B6.V-Lepob/JUnib (ob/ob) mice showed a significant increase in Notch1 activation and aerobic training was able to reduce the cleaved domain of Nocth1 as well as key proteins controlled by it. Finally, it was found that the overexpression of Notch1 and NICD in liver cells resulted in an increase in gluconeogenesis and lipogenesis enzymes, corroborating the in vivo results. Therefore, the results found in the study elucidate, for the first time, new mechanisms by which physical exercise acts to improve liver metabolism and suggests Notch1 as a potential therapeutic target in the damage associated with obesity.

Keywords: Physical training; obesity; liver; insulin resistance; Notch1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	30
Figura 2.	35
Figura 3.	36
Figura 4.	37
Figura 5.	38
Figura 6.	39
Figura 7.	49
Figura 8.	51
Figura 9.	52
Figura 10.	53
Figura 11.	54
Figura 12.	55
Figura 13.	57
Figura 14.	58
Figura 15.	60
Figura 16.	61
Figura 17.	62
Figura 18.	64
Figura 19.	65
Figura 20.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dieta hiperlipídica	41
Tabela 2. Lista de primers	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP1: Proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E 1

ACC: Acetil-CoA carboxilase

Akt: Proteína quinase B

CEMIB: Centro multidisciplinar para investigação biológica na área da ciência de animais de laboratório

CEUA: Comissão de Ética no uso de Animal

CoA: Coenzima A

CPT: Carnitina palmitoil transferase

CTL: Controle

DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica

DLL: Proteínas da família delta-like

DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2

FAS: Ácido graxo sintase

FoxO1: Forkhead BOX 01

G6Pase: Glicose 6-fosfatase

GSK3: glicogênio sintase 3

HES: Hairy and Enhancer of Split homologues

Hey1: Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1

i.p.: Intraperitoneal

IR: Receptor de insulina

IRS: Substrato do receptor de insulina

I κ B- α : de Ikappa quinase B-alfa

Jag: proteínas da família Jagged

KO: knockout

MAFLD: metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease

mTORC1: Complexo 1 da proteína alvo de rapamicina em mamíferos

NECD: Domínio extracelular da Notch

NF- κ B: fator nuclear kappa B

NICD: Domínio intracelular da Notch

OBEX: Obese exercício

OBS: Obeso sedentário

Ob/ob: B6.V-Lepob/JUnib

OMS: Organização mundial da saúde

PCB: Piruvato carboxilase

PDK: Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos

PEPCK: Fosfoenolpiruvatocarboxiquinase

PHG: Produção hepática de glicose

PI3Q: Fosfatidil-inositol-3-quinase

Rbpj: Recombination recognition sequence binding protein at the kappa J site

SCD1: Esteroil-CoA dessaturase

SREBP-1C: Proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol

TLR4: Receptor do tipo toll 4

TM: Transmembranar

TTG: Teste de toletância à glicose

TTI: Teste de toletância à Insulina

TTP: Teste de toletância ao piruvato

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

VE: Velocidade de exaustão

WB: Western Blotting

LISTA DE SÍMBOLOS

β : Beta

γ : Gama

μ : Micro

®: Registrado

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO 1: OBESIDADE E DANOS HEPÁTICOS	22
CAPÍTULO 2: NOTCH1 E TECIDO HEPÁTICO	26
CAPÍTULO 3: TREINAMENTO FÍSICO E DHGNA	31
JUSTIFICATIVA	32
HIPÓTESE.....	34
OBJETIVO GERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
MATERIAIS E MÉTODO.....	40
ANIMAIS	40
PROTOCOLO DE ADAPTAÇÃO À ESTEIRA ROLANTE	41
PROTOCOLO DE CARGA INCREMENTAL.....	41
PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO	42
TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG).....	42
TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (TTI)	42
TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (TTP).....	43
INGESTÃO ALIMENTAR.....	43
EUTANÁSIA, EXTRAÇÃO TECIDUAL, COLETA DE SANGUE E ANÁLISE SÉRICA	43
TRIGLICÉRIDES HEPÁTICO.....	44
WESTERN BLOTTING.....	44
EXTRAÇÃO NUCLEAR	44
REAL TIME PCR QUANTITATIVO (RT-QPCR).....	45
INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA NOTCH1	46
ISOLAMENTO MITOCONDRIAL	47
RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL	47
HISTOLOGIA: EOSINA E HEMATOXILINA	48
CULTURA DE CÉLULAS E TRATAMENTOS	48
ESTATÍSTICA.....	49
RESULTADOS.....	51
DIETA RICA EM GORDURA SATURADA INDUZ INTOLERÂNCIA AO PIRUVATO	51
TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO MELHORA A PERFORMANCE NO PROTOCOLO DE CARGA INCREMENTAL	52
TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO REDUZ ADIPOSIDADE, MAS NÃO A INGESTÃO ALIMENTAR EM CAMUNDONGOS OBESOS.....	52
EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO MELHORA O PERFIL LIPÍDICO DE CAMUNDONGOS OBESOS	53
EXERCÍCIO FÍSICO AUMENTA A TOLERÂNCIA À GLICOSE E A SENSIBILIDADE À INSULINA.....	54
SINALIZAÇÃO DA NOTCH1 HEPÁTICA É SUPRIMIDA PELO EXERCÍCIO FÍSICO.....	55
TREINAMENTO AERÓBIO REDUZ A GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS OBESOS	58
TREINAMENTO AERÓBIO REDUZ O ACÚMULO DE LÍPÍDEOS HEPÁTICO EM CAMUNDONGOS OBESOS	59
EXERCÍCIO FÍSICO RESTABELECE RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS OBESOS.....	60
INIBIÇÃO DO COMPLEXO GAMA-SECRETASE MELHORA TOLERÂNCIA AO PIRUVATO E A GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA	62
EXERCÍCIO FÍSICO REDUZ ATIVAÇÃO DE NOTCH1 NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS OB/OB	63
SUPEREXPRESSION DA NOTCH1 AUMENTA PEPCK E SREBP-1C EM CÉLULAS HEPA.....	64

INIBIÇÃO DO COMPLEXO GAMA SECRETASE NÃO REDUZIU O ACÚMULO DE LIPÍDEOS EM CELULAS HEPG2.....	65
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXO	82
APÊNDICE	86
LISTA DE PUBLICAÇÃO	86

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença caracterizada por excesso de adiposidade corporal sendo considerada um dos maiores problemas de saúde pública mundial. No Brasil, segundo a organização mundial da saúde (OMS) metade da população brasileira encontra-se acima da massa corporal ideal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Dentre os distúrbios metabólicos decorrentes da obesidade, destaca-se o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), tendo a resistência à insulina como a gênese para o desenvolvimento de tais comorbidades (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

A resistência à insulina resulta no aumento da lipólise promovendo um maior direcionamento de ácidos graxos livres para o fígado, culminando em acúmulo de triacilgliceróis (TAG) no tecido hepático e mais tardiamente o desencadeamento da DHGNA (SAVAGE; SEMPLE, 2010). Atualmente, especula-se que a DHGNA atinge um bilhão de indivíduos no mundo todo (LOOMBA; FRIEDMAN; SHULMAN, 2021). Se não controlada de maneira eficiente, a DHGNA pode evoluir para esteatohepatite não alcoólica, cirrose e alguns tipos de carcinoma hepático (KITADE et al., 2017). A DHGNA por si pode aumentar o risco do desenvolvimento de outras doenças metabólicas, como doenças cardiovasculares e DM2, fazendo com que os pesquisadores sugerissem renomear essa doença como *metabolic (dysfunction) associated fatty liver disease* (MAFLD). Apesar disso, os mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento da doença e um tratamento efetivo continuam sendo debatidos, uma vez que ainda não foram totalmente elucidados (LI et al., 2015).

Além do acúmulo de gordura hepática, a resistência à insulina favorece o aumento da produção hepática de glicose (PHG), uma vez que a insulina é capaz de suprimir a gliconeogênese através da regulação da expressão gênica de enzimas-chaves da PHG (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). Sendo assim, a ineficiência na supressão da gliconeogênese exacerbada é considerada um elemento-chave para a hiperglicemia observada em pacientes com DM2 (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017).

Paralelamente aos efeitos da insulina, a deleção da proteína Notch mostrou-se um

importante alvo terapêutico, atenuando ambos os processos metabólicos (lipogênese e gliconeogênese) no tecido hepático de camundongos (PAJVANI et al., 2011, 2013). As proteínas da família Notch são receptores transmembranas e possuem 4 isoformas (Notch 1 - 4), sendo que todas as isoformas possuem três domínios, um extracelular (NECD), um transmembranar (TM) e um domínio intracelular (NICD) (BI; KUANG, 2015). No fígado, tanto de humanos como animais, há a presença de todas as isoformas dos receptores Notch, no entanto, as isoformas 1 e 2 são predominantemente expressas no tecido hepático (CZECH, 2013). A ativação da Notch é constatada por meio de sua clivagem, e uma vez clivado, o domínio NICD aumenta a lipogênese e a gliconeogênese no fígado por meio da interação de fatores de transcrição presentes no núcleo celular (PAJVANI et al., 2011, 2013 BI; KUANG, 2015). Esses achados evidenciam a importância de explorar o entendimento da modulação da proteína Notch, uma vez que ela está diretamente relacionada com o acúmulo de lipídios e a produção de glicose no fígado (VALENTI et al., 2013).

Nesse cenário, o exercício físico, seja ele aeróbio ou de força, também tem sido utilizado como intervenção com efeitos relevantes sobre o metabolismo de glicose e gordura no fígado (GASPAR et al., 2019a; KNUDSEN et al., 2016; MARINHO et al., 2012; PEREIRA et al., 2019). No entanto, os mecanismos moleculares de ação e que levam a estes efeitos mediados pelo exercício ainda não foram totalmente elucidados. Além disso, os efeitos do exercício físico em regular a proteína Notch no fígado são desconhecidos.

Em relação a DHGNA, os ensaios clínicos mostram que a perda de peso está diretamente associada a redução da esteatose hepática, porém apenas o exercício físico mostrou-se capaz de reduzir a esteatose independente da perda de peso (HANNAH; HARRISON, 2016). Embora seja conhecido os efeitos positivo do exercício sobre o metabolismo hepático há muitas lacunas em relação sinalizações proteicas e modulação de genes hepáticos por meio do exercício físico aeróbio, o que poderá compreender melhor esse fenômeno e abrir novas perspectivas para o tratamento da doença. Do ponto de vista glicêmico, um estudo em nosso laboratório mostrou que a redução no conteúdo de a piruvato carboxilase (PCB), em camundongos treinados em esteira, foi acompanhado na melhora da homeostase glicêmica, tornando-a um importante alvo

de estudo (MUÑOZ et al., 2017). Além disso, o exercício aeróbico mostrou uma ação supressora na PHG, em animais obesos, sendo os efeitos relacionados a regulação das enzimas gliconeogênicas Fosfoenolpiruvatocarboxiquinase (PEPCK) e Glicose 6-fosfatase (G6Pase) (MARINHO et al., 2012). No entanto, os efeitos do exercício físico em regular a proteína Notch1 e esses processos hepáticos merecem atenção.

Sendo assim, uma área relevante de investigação é avaliar o efeito do exercício físico aeróbico na lipogênese e na gliconeogênese hepática de camundongos obesos. Ademais, verificar se o treinamento físico é capaz de reduzir o acúmulo de gordura no fígado e a PHG, através da sinalização da Notch1, mostra-se promissor e importante em atenuar os distúrbios metabólicos relacionados a obesidade e ao DM2.

CAPÍTULO 1: OBESIDADE E DANOS HEPÁTICOS

A obesidade é caracterizada, segundo a OMS, pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura no corpo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). A origem da obesidade pode estar envolvida com fatores genéticos bem como a fatores ambientais (GLUCKMAN et al., 2011). Entretanto, uma ínfima porcentagem de indivíduos obesos apresenta disfunções de ordem genética. Sendo assim, as condições ambientais como sedentarismo e alimentação hipercalórica tornam-se um contundente aliado para o desenvolvimento da obesidade (GLUCKMAN et al., 2011).

Dentre as consequências geradas pela adiposidade, destaca-se a resistência à ação da insulina (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). A insulina é capaz de regular a captação de glicose, oxidação de gordura, produção hepática de glicose e a lipogênese. Desse modo, alterações na sinalização deste hormônio são elementos chaves para o desencadeamento de DM2, dislipidemia e DHGNA (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

Modelos experimentais de obesidade, induzidos por uma dieta hipercalórica, rica em gordura saturada, apresentam resistência à insulina em tecidos periféricos como tecido adiposo branco e fígado (DA LUZ et al., 2011). No tecido adiposo, principal estoque energético, a resistência à insulina impede que a lipólise seja interrompida, resultando no aumento de triacilgliceróis e ácidos graxos livres na corrente sanguínea (KITADE et al., 2017). Sendo assim, esses metabolitos são captados pelo fígado, onde parte deles serão transportados, pelas proteínas carnitina palmitoil transferase (CPT), para as mitocôndrias e serão oxidados (β -oxidação), e outra parte será sintetizada (lipogênese) e armazenada nas células hepáticas, dando origem a esteatose hepática (MEEX; WATT, 2017). Além disso, outro processo hepático, a lipogênese de novo, pode ser desencadeada por dietas ricas em gordura saturada, carboidratos e frutose, que consiste na síntese de ácidos graxos novos a partir de glicose, aminoácidos e carboidratos (MEEX; WATT, 2017).

Nesse sentido, os níveis de glicose sérica são essenciais para o processo de lipogênese, uma vez que a glicose é convertida em acetil-coenzima A (acetil-CoA) e posteriormente em malonil-CoA, sendo esse o principal substrato para a lipogênese (MEEX; WATT, 2017). Para

que ocorra a lipogênese, a ação das enzimas ACC (acetil-CoA carboxilase), a Fas (ácido graxo sintase) e a SCD1 (esteroil-CoA dessaturase) são essenciais. A ACC é responsável pela conversão de acetil-CoA em malonil-CoA, enquanto a Fas sintetiza ácidos graxos, de cadeia longa, a partir do malonil-CoA e a SCD1, por sua vez, converte malonil-CoA em ácidos graxos monoinsaturados (NAKAMURA; YUDELL; LOOR, 2014). Desse modo, foi verificado que animais obesos, hiperglicêmicos apresentam aumento no conteúdo proteico de ACC, Fas e SCD1 (FREDERICO et al., 2011). Adicionalmente, a hiperglicemia resulta em aumento da produção e secreção de insulina, principal hormônio regulador da lipogênese (TITCHENELL; LAZAR; BIRNBAUM, 2017).

A insulina atua de forma contundente no controle da lipogênese hepática por meio da ativação do fator de transcrição SREBP-1C (proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol). O SREBP-1C controla a expressão gênica de ACC, Fas e SCD1 (TITCHENELL; LAZAR; BIRNBAUM, 2017). Por meio da insulina, a proteína quinase B (Akt), pertencente a sinalização intracelular da insulina, é capaz de ativar o complexo mTORC1 (complexo 1 da proteína alvo de rapamicina em mamíferos) e esse por sua vez, ativar o fator de transcrição SREBP-1C (QUINN; BIRNBAUM, 2012). A importância de se estudar essa via foi demonstrada através da inibição do fator de transcrição lipogênico. Frederico e colaboradores (2011) demonstraram que a inibição de SREBP-1C reverteu o acúmulo de gordura hepática em camundongos Swiss obesos induzidos por dieta (FREDERICO et al., 2011).

Além da lipogênese, a insulina apresenta um papel crucial no metabolismo glicêmico, uma vez que fígado possui capacidade de produzir glicose durante períodos de jejum e estresse metabólico (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). Dessa maneira, a resistência à insulina no tecido hepático apresenta importantes implicações na supressão da gliconeogênese e consequentemente aumento da glicemia (hiperglicemia) em estado de jejum e alimentado (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). Nesse sentido, a hiperglicemia crônica somada a redução da produção de insulina pelas células β -pancreáticas são anormalidades presentes no DM2 e complicações associadas (KIM-MULLER et al., 2014).

A maneira pela qual a insulina controla a produção hepática de glicose ocorre a partir

do reconhecimento da insulina pelo seu receptor, receptor de insulina (IR). Após a ligação do hormônio ao receptor ocorre uma alteração na conformação do IR e conseqüentemente sua ativação. Uma vez ativo, o IR é capaz de fosforilar os substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS1 e IRS2), o que os torna ativos, estimulando a sua associação com a proteína PI3Q (fosfatidil-inositol-3-quinase) (PETERSEN; SHULMAN, 2018). A PI3Q ativa a proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos (PDK). A PDK por sua vez, atrai a Akt, e conseqüente fosforilação. A Akt é uma proteína capaz de regular diferentes moléculas envolvidas em diversas vias metabólicas, por exemplo, a síntese de glicogênio, por meio da fosforilação da GSK3 (glicogênio sintase 3). Além disso, a Akt é capaz de fosforilar o fator de transcrição FoxO1 (forkhead BOX 01), importante regulador da gliconeogênese, uma vez que a FoxO1 transcreve proteínas chaves dessa via metabólica (PETERSEN; SHULMAN, 2018).

Ao longo do tempo a FoxO1 se tornou um importante alvo de investigação devido a sua efetiva contribuição no processo de gliconeogênese (CHENG, 2015). Nesse sentido, verificaram que superexpressão da FoxO1 resultou no aumento de G6Pase (glicose 6-fosfatase) (MATSUMOTO et al., 2006). No entanto, quando inibida, especificamente no fígado, os animais knockout (KO) de FoxO1 apresentam hipoglicemia de jejum (MATSUMOTO et al., 2007).

Não muito distante, foi demonstrado a importância da sinalização da insulina na regulação da FoxO1 através de modelos experimentais modificados geneticamente, utilizando animais que sofreram deleção do IR apenas no fígado. Essa modificação gênica resultou em severa resistência à insulina. Entretanto, ao analisarem animais que sofreram a deleção da FoxO1, juntamente ao IR, tais prejuízos eram revertidos e conseqüentemente eram verificados menor expressão de PEPCK e G6Pase. Tornando a FoxO1 um importante alvo terapêutico para manutenção da homeostase glicêmica (O-SULLIVAN et al., 2015).

De forma bem estabelecida na literatura, observa-se que modelos experimentais de obesidade, induzida por dieta rica em gordura saturada, apresentam prejuízos na propagação do sinal intracelular da insulina no tecido hepático e conseqüentemente menor fosforilação da FoxO1 hepática, culminado em perda da homeostase glicêmica (MARINHO et al., 2012). Ademais, no núcleo celular, outras proteínas (PGC-1 α e HNF-4 α) ao associarem-se com a

FoxO1, favorecem o aumento da transcrição de PEPCK (fosfoenolpiruvatocarboxiquinase) e G6Pase (PETERSEN; SHULMAN, 2018). Apesar da significativa contribuição da insulina no controle da lipogênese e da produção hepática de glicose, uma publicação recente demonstrou que a proteína Notch1 é essencial para o metabolismo hepático, sendo essa sinalização capaz de controlar o acúmulo de gordura no fígado e a gliconeogênese, assim como a insulina (BI; KUANG, 2015). Portanto, a Notch1 passou ser uma molécula de interesse na investigação no controle de mecanismos moleculares no tecido hepático.

CAPÍTULO 2: NOTCH1 E TECIDO HEPÁTICO

Os receptores da família Notch estão envolvidos em diferentes processos celulares, dentre eles proliferação, ciclo e comunicação celular, sendo a sinalização mediada pela Notch conservada em invertebrados e humanos e inseridas em algumas condições patológicas (HORI; SEN; ARTAVANIS-TSAKONAS, 2013).

Por ser uma proteína envolvida com a comunicação celular, moléculas presentes em células adjacentes interagem com os receptores Notch, dentre elas encontram-se as proteínas da família Delta-like (DLL1 - 4) e as proteínas da família Jagged (Jag1 e Jag2), denominadas proteínas ligantes da Notch (PAJVANI et al., 2011). O início da sinalização da Notch acontece quando a Notch interage com um de seus ligantes presentes em células vizinhas. Tal fato promove mudança conformacional nos receptores Notch, facilitando o processo de clivagem de seus domínios e assim iniciando a propagação de sua sinalização (BI; KUANG, 2015).

A primeira clivagem da Notch ocorre no processo de maturação, o que permite o dobramento correto da proteína, tornando-a madura. Posteriormente, ao se associar a um de seus ligantes, a mudança conformacional expõe o sítio de clivagem S2, no domínio extracelular da Notch. Tal etapa facilita a terceira clivagem (S3) no domínio intramembranar mediada pelo complexo presilina- γ -secretase, permitindo que o domínio NICD se desassocie da membrana celular e migre-se ao núcleo (HORI; SEN; ARTAVANIS-TSAKONAS, 2013).

Ao se desprender do domínio TM, o NICD migra para o núcleo celular associando-se a fatores de transcrição e, por conseguinte, participando da regulação gênica de algumas proteínas (CZECH, 2013). Nesse sentido, foi observado que após jejum de 18 horas, seguido de realimentação, o conteúdo de NICD após 2 horas de alimentação apresenta-se reduzido. Porém, com quatro horas de realimentação, o conteúdo proteico de NICD aumenta assim como o conteúdo de RNAm de ACC1, Fas, SREBP-1C e de Hey1 (proteínas relacionadas a família da HES) (PAJVANI et al., 2013). A Hey1, são proteínas reguladas pela interação de NICD com o fator de transcrição ativo pela Notch. Nesse sentido, foi observado que em modelos experimentais de obesidade, que as proteínas Hey1 mostram-se aumentadas, quando comparados com animais controle (PAJVANI et al., 2013).

Em humanos, avaliou-se fígado de pacientes com obesidade mórbida submetidos a cirurgia bariátrica. Interessantemente, estabeleceu-se uma correlação positiva entre os subprodutos da ativação da Notch com as enzimas pertencentes a produção hepática de glicose. Por fim, verificou-se correlação positiva entre os receptores Notch com a doença hepática não gordurosa e resistência à insulina, confirmando a relevância de ampliar o conhecimento sobre essa molécula (VALENTI et al., 2013).

O domínio NICD atua de forma contundente no processo de acúmulo de lipídeos no tecido hepático. A translocação do domínio intracelular da Notch para o núcleo promove sua associação com o fator de transcrição Rbpj (recombination recognition sequence binding protein at the kappa J site), favorecendo a estabilidade do complexo mTORC1 (BI; KUANG, 2015). O complexo mTORC1 por sua vez é capaz de ativar a proteína SREBP-1C, responsável pela transcrição de proteínas chaves no processo de lipogênese no tecido hepático (QUINN; BIRNBAUM, 2012).

Nesse sentido, Pajvani e colaboradores (2013) observaram que animais obesos induzidos por dieta apresentaram uma tendência em aumentar NICD e animais deficientes de leptina (ob/ob) e de seu receptor (db/db) apresentaram aumento dos transcritos de Rbpj (PAJVANI et al., 2013). Posteriormente, observaram que animais com deleção de Rbpj exclusivamente no fígado (L-Rbpj), apresentaram resistência no acúmulo de lipídios no tecido hepático após a exposição de dieta indutora de obesidade (PAJVANI et al., 2013). Ainda, esses animais mostraram atenuação das proteínas p-mTOR e p-4EBP1 (proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E 1), proteínas relacionadas ao complexo mTORC1. Por outro lado, a superexpressão de NICD, resultou em aumento das proteínas p-mTOR e p-4EBP1 e consequentemente SREBP-1C e Fas, culminando em aumento do acúmulo lipídico no fígado de roedores. Por fim, a inibição da proteína Raptor pelo tratamento de rapamicina, atenuou a transcrição gênica de Fas nos roedores NICD superexpressos. Sendo assim, os resultados encontrados sugerem a ação direta do domínio no acúmulo de lipídios no fígado, favorecendo a estabilidade do complexo mTORC1 e aumento de SREBP-1C e Fas (PAJVANI et al., 2013).

Recentemente, foi observado que a animais obesos induzidos por dieta e animais db/db

apresentam aumento no conteúdo proteico e de RNAm de Notch1 no fígado (SONG et al., 2016). Dessa forma, através de diferentes inibições, interessantes achados foram descritos. A inibição de Notch1 preveniu a resistência à insulina em animais expostos a dieta hiperlipídica. Além disso, observou-se que sua deleção promoveu aumento na transcrição de genes envolvidos com oxidação lipídica. Sendo assim, *in vitro*, a ativação de Notch1 resultou em diminuição da oxidação lipídica, confirmando as evidências obtidas *in vivo* (SONG et al., 2016).

Assim como a Notch1 é uma forte contribuinte no controle da lipogênese, este receptor também participa do controle da PHG. Ao se desprender do domínio TM, o NICD migra para o núcleo celular associando-se a fatores de transcrição e, por conseguinte, participando da regulação gênica de algumas proteínas, como as responsáveis pela gliconeogênese hepática (BI; KUANG, 2015). Nesse sentido, um interessante experimento foi realizado, a fim de verificar o papel da Notch1 no controle de ambas as vias no tecido hepático (PAJVANI et al., 2013). Pajvani e colaboradores, observaram que em condições de jejum os níveis de NICD aumentam de forma gradativa nos tempos de 4, 12 e 18 horas de jejum. Durante esse período de jejum, concomitante ao aumento de NICD, há aumento da transcrição de genes relacionados a gliconeogênese. Entretanto, após a realimentação, o conteúdo de NICD é reduzido após 2 e 4 horas de alimentação. Após esse período, observa-se aumento do conteúdo proteico de NICD e aumento da expressão gênica de marcadores de lipogênese (PAJVANI et al., 2011). Dessa maneira, a Notch1 mostra-se uma molécula chave para os diferentes mecanismos hepáticos. A maneira pela qual o domínio participa da regulação da produção hepática de glicose ocorre através de uma ação combinada com a FoxO1 (HORI; SEN; ARTAVANIS-TSAKONAS, 2013).

A fim de confirmar a participação do NICD na PHG utilizou-se animais KO heterozigotos de FoxO1 e Notch1 (PAJVANI et al., 2011). Dessa maneira, tais animais apresentam melhora na sensibilidade a insulina e conseqüente atenuação na expressão gênica de G6P. Inversamente os achados anteriores, a superexpressão hepática de Notch1 no fígado resultou em aumento da glicemia e insulinemia de jejum e alimentada, concomitante com aumento do conteúdo de RNA G6Pase (PAJVANI et al., 2011). Por fim, utilizando uma droga específica contra γ -secretases, observou-se redução nos parâmetros glicêmicos de animais

obesos induzidos por dietas e animais ob/ob, modelos experimentais de obesidade (PAJVANI et al., 2011).

Em análises de fígado de humanos obesos mórbidos submetidos a cirurgia bariátrica, verificou-se correlação positiva entre os substratos da Notch com as enzimas pertencentes a produção hepática de glicose (VALENTI et al., 2013). Por fim, observou-se correlação positiva entre os receptores Notch com a doença hepática não gordurosa e resistência à insulina, confirmando a relevância de ampliar o conhecimento sobre essa molécula (VALENTI et al., 2013). Em cultura celular de hepatócitos, verificou-se que a exposição de ácidos graxos induziu o aumento de Notch1 e de NICD, sugerindo que a ativação de Notch1 pode ser desencadeada por lipídeos (ZHANG et al., 2021). Além disso, observou-se que modelos experimentais de obesidade, seja o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta ou por alteração gênica, apresentaram aumento significativo de Notch1 no tecido hepático (PAJVANI et al., 2013; SONG et al., 2016).

A figura 1, tem como objetivo facilitar a compreensão e o entendimento, de forma ilustrativa, da via da proteína Notch1 e a maneira pela qual esta proteína exerce o controle da lipogênese e da gliconeogênese hepática.

Além da obesidade, outro fator que se mostra um modulador da Notch é o exercício físico. Em humanos, verificou-se que uma sessão de exercício físico foi capaz de modular 938 genes, dentre eles a Notch1, no músculo vasto lateral (CATOIRE et al., 2012). Sendo assim, o exercício físico mostra-se uma intervenção capaz de modular a proteína Notch, porém não há registros sobre o efeito do exercício físico, intensidade e tipos de exercício sobre a Notch1 hepática bem como em um contexto de obesidade.

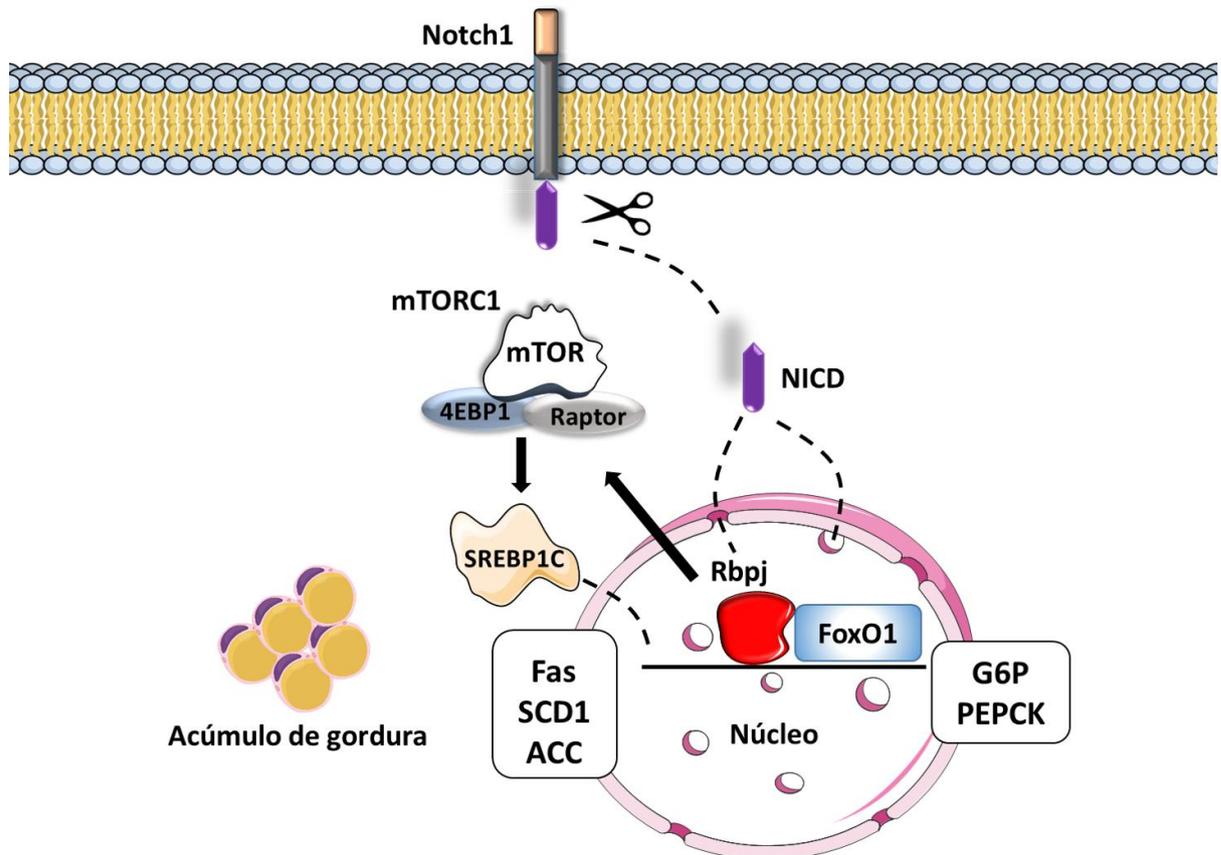


Figura 1. Via de sinalização da Notch1. A Notch1 ao ser clivada, se desprende e libera o domínio intracelular (NICD). Uma vez desancorado, o domínio NICD migra ao núcleo e associa-se com os fatores de transcrição Rbpj e FoxO1, promovendo a estabilização do complexo mTORC1 e aumento da transcrição de enzimas chaves na gliconeogênese, respectivamente.

CAPÍTULO 3: TREINAMENTO FÍSICO E DHGNA

Diante da situação que se encontra a obesidade e sua íntima relação com o sedentarismo, alterações no estilo de vida se tornou uma peça-chave no combate a obesidade. Além disso, as mudanças habituais, como a prática de exercício físico, tornaram-se parte do tratamento da DHGNA (HANNAH; HARRISON, 2016), assim como para tratamento do DM2 (UMPIERRE et al., 2011).

O exercício físico apresenta efeitos benéficos ao tecido hepático (GASPAR et al., 2019a; TSUZUKI et al., 2015). Em relação a esteatose hepática, a redução da massa corporal é um ponto crucial para a atenuação no quadro, porém, o exercício físico mostrou-se capaz de melhorar o acúmulo de gordura no fígado independente da redução da adiposidade corporal (HANNAH; HARRISON, 2016). Ademais, o exercício físico aeróbio apresenta um relevante papel controle da DHGNA (GUO et al., 2015; MUÑOZ et al., 2018).

Em camundongos obesos induzidos por dieta, observou-se que 3 semanas de treinamento aeróbio de corrida em esteira foi eficiente em aumentar a concentração de glicogênio hepático e reduzir os níveis de triglicerídeos no fígado quando comparados aos animais obesos sedentários. Do ponto de vista molecular, verificaram que os animais treinados apresentaram aumento nos genes de oxidação lipídica e redução no conteúdo de RNAm de genes associados a lipogênese (ALEX et al., 2015).

Apesar de ser uma intervenção benéfica para o controle da lipogênese na doença gordurosa hepática não alcoólica, recentemente foi publicado que o exercício físico excessivo (overtraining), induz o aumento de acúmulo de gordura hepática, modulando importantes proteínas no controle da lipogênese como p-Akt, p-mTOR, p-4EBP1, precursor de SREBP-1. Sendo assim, maiores investigações sobre o exercício físico, como volume, intensidade e tipo de exercício mostram-se fundamentais para o tratamento de DHGNA (DA ROCHA et al., 2017).

Em relação a produção hepática de glicose, observou-se que o exercício agudo de natação (quatro sessões de 30 minutos separados por 5 minutos de intervalo) foi capaz de melhorar a homeostase glicêmica e a atividade de proteínas chaves na sinalização da insulina,

culminado na diminuição da fosforilação da FoxO1 e da associação FoxO1/HFN-4 α e assim diminuir o conteúdo proteico de G6P e PEPCK em animais obesos induzidos por dieta e animais ob/ob (DE SOUZA et al., 2010).

Não obstante, animais obesos expostos a roda de atividade física voluntária apresentaram alterações moleculares hepáticas. Esses animais apresentaram melhora nos parâmetros glicêmicos acompanhado de redução da inflamação hepática e aumento da fosforilação de IRS1. Além disso, o exercício físico feito de forma voluntária reduziu a S-nitrosação de IRS1 e Akt, melhorando a sinalização da insulina no fígado e a homeostase glicêmica (TSUZUKI et al., 2015).

Por fim, nosso grupo de pesquisa, demonstrou recentemente o papel do exercício no controle da produção hepática de glicose, através da modulação da enzima PCB, que tem como função a conversão de piruvato em oxaloacetato, primeiro passo da gliconeogênese, que ocorre dentro da mitocôndria (MUÑOZ et al., 2017).

Desse modo, torna-se necessário maiores investigações sobre os possíveis mecanismos capazes de ser modulado pelo exercício físico no controle da lipogênese e da produção hepática de glicose de forma independente da insulina, tornando assim, a sinalização da Notch1 um relevante alvo de investigação no contexto da exacerbação da gliconeogênese pelo fígado e doença hepática gordurosa não alcoólica.

JUSTIFICATIVA

Atualmente as mudanças no estilo de vida tem favorecido o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, dentre essas destaca-se a obesidade e o DM2, acarretando severos danos hepáticos (OGURTSOVA et al., 2017). Diante do impacto da doença hepática gordurosa e da hiperglicemia na qualidade e expectativa de vida de pacientes com obesidade e resistência à insulina, estratégias capazes de atenuar a lipogênese e a gliconeogênese exacerbada no fígado permanecem como um grande desafio. No entanto, poucas terapias mostram-se eficazes no tratamento das desordens hepáticas promovidas pela obesidade (GOEDEKE; PERRY; SHULMAN, 2019). Nesse sentido, a resistência à insulina parece ser o

ponto comum entre o acúmulo exacerbado de lipídios e a perda no controle da gliconeogênese, no entanto, estudos tem mostrado que mesmo na ausência de proteínas chaves na transdução do sinal da insulina, há uma supressão na produção hepática de glicose no fígado de roedores, sugerindo a ação de outras moléculas nesse processo (DONG et al., 2008). A proteína Notch1 tem sido sugerida como um importante alvo de pesquisa, uma vez que ela é capaz de regular a expressão de enzimas gliconeogênicas bem como lipogênese hepática (PAJVANI; ACCILI, 2015). Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da Notch1 no fígado e alguns dados mostram-se controversos (BERNSMEIER et al., 2016). Por outro lado, de maneira bem consolidada na literatura, sabe-se que uma das principais intervenções no tratamento dos danos hepáticos é a perda de peso e a mudança no estilo de vida (PETERSEN et al., 2005; THYFAULT; SCOTT RECTOR, 2020). Contudo, tem sido observado que o exercício físico é capaz de reduzir a produção de glicose e bem como o acúmulo lipídios hepáticos independente da perda de peso (HANNAH; HARRISON, 2016; PEREIRA et al., 2019). Apesar disso, pouco se sabe os mecanismos pelos quais o treinamento físico é capaz de estabelecer tais benefícios no fígado bem como em outras doenças, tornando-se fundamental maiores investigações científicas envolvendo essa temática (HAWLEY et al., 2014). Ainda, o conhecimento sobre os efeitos do exercício físico sobre a sinalização da Notch1 encontra-se limitado. Portanto, propomos um estudo experimental, pré-clínico, para investigar especificamente a contribuição do exercício físico aeróbio na possível atenuação destes distúrbios metabólicos (lipogênese e gliconeogênese) induzidos pela obesidade, através da via de sinalização da Notch1.

HIPÓTESE

Mediante a relevância da proteína Notch1 no controle da homeostase glicêmica e no acúmulo de lipídeos no tecido hepático, elaboramos a hipótese de que o exercício físico aeróbio pode ser eficiente em modular o conteúdo proteico da Notch1 e a sua sinalização intracelular no fígado de animais obesos induzidos por dieta, compreendendo novos mecanismos e vias celulares na atenuação do acúmulo exacerbado de gordura e da produção de glicose hepática.

OBJETIVO GERAL

O objetivo principal desse estudo é investigar o papel do exercício físico aeróbio na modulação da proteína Notch1 e o seus efeitos na lipogênese e gliconeogênese no fígado de camundongos obesos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram descritos abaixo e sumarizados nas figuras ilustrativas a seguir. Assim, o desenvolvimento do projeto ocorreu em 5 etapas.

Etapa 1: Efeitos do treinamento físico na modulação da Notch1:

- a- Avaliar o efeito do exercício na regulação da Notch1 no fígado de camundongos *Swiss* e *ob/ob*;
- b- Verificar os níveis das proteínas pertencente ao complexo γ -secretase;
- c- Analisar o conteúdo proteico de NICD total e nuclear;
- d- Mensurar a FoxO1 nuclear;
- e- Quantificar o conteúdo proteico de Rbpj e os níveis de RNAm de Hes1 e Hey1.

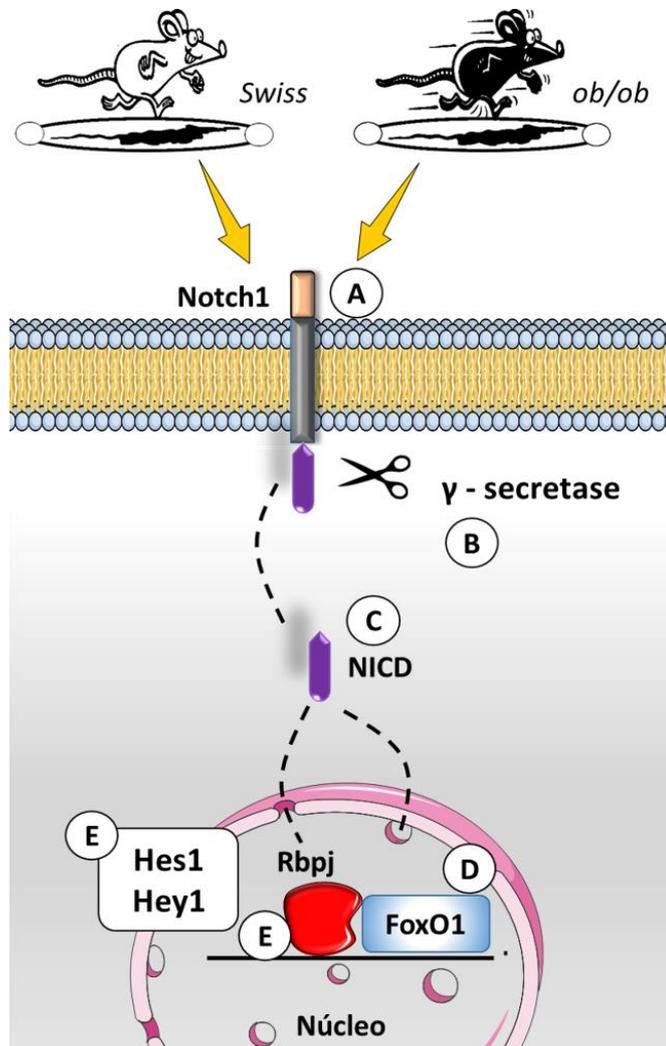


Figura 2. A etapa 1 do projeto. Analisar o efeito do treinamento físico aeróbio sobre a sinalização hepática de Notch1 em camundongos obesos.

Etapa 2: Ações do treinamento aeróbio na gliconeogênese hepática:

- a- Investigar a tolerância ao piruvato dos diferentes camundongos;
- b- Medir o conteúdo proteico e de RNAm de G6Pase, PEPCK e PCB no fígado após o desenho experimental.

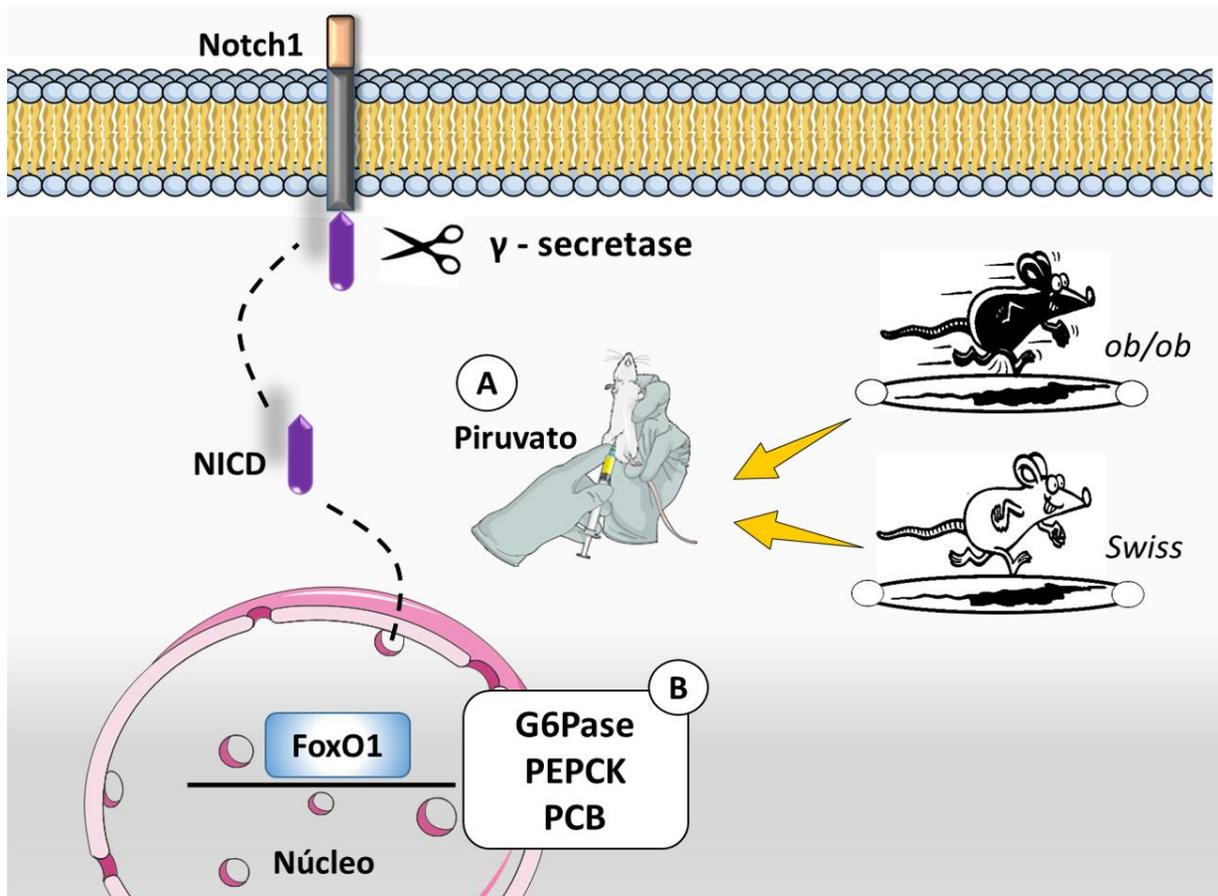


Figura 3. Etapa 2 do projeto. Identificar a eficiência do treinamento aeróbio na via da gliconeogênese.

Etapa 3: Efeito do exercício físico sobre a via da lipogênese hepática:

- a- Avaliar as proteínas que compõem o complexo mTORC1;
- b- Investigar os níveis das proteínas que atuam na lipogênese e oxidação lipídica;
- c- Analisar o acúmulo de gordura por meio de técnicas histológicas;
- d- Quantificar a respiração mitocondrial do tecido hepático.

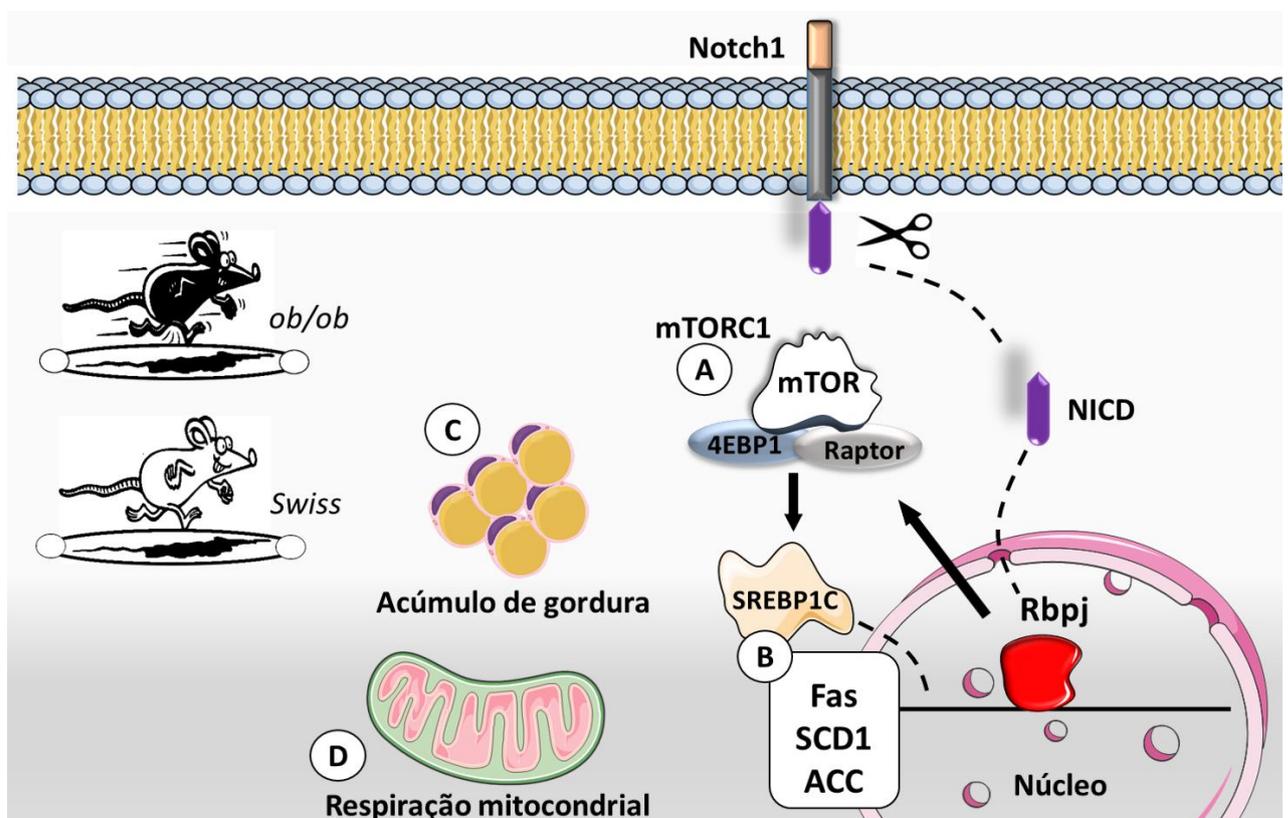


Figura 4. Etapa 3 do projeto. Identificar os efeitos do exercício aeróbio no metabolismo hepático.

Etapa 4: Inibição do complexo γ -secretase em camundongos obesos:

- a- Mensurar a intolerância ao piruvato após injeção de DAPT;
- b- Verificar o conteúdo proteico de NICD e das enzimas da gliconeogênese;
- c- Avaliar o acúmulo de gordura por meio de técnicas histológicas;

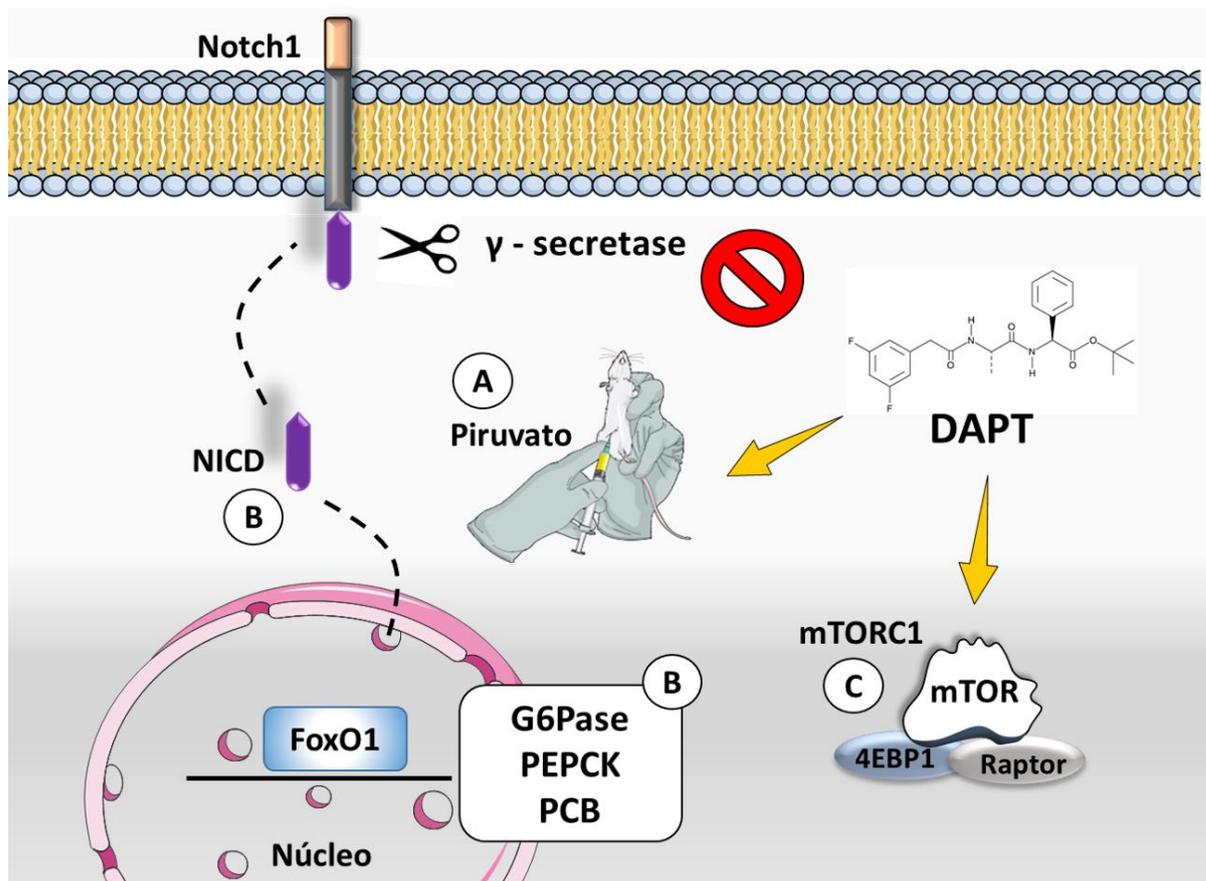


Figura 5. Etapa 4 do projeto. Avaliar o efeito da inibição do complexo γ -secretase nas vias de sinalização reguladas pela Notch1.

Etapa 5: Caracterização dos efeitos da Notch1 em linhagens celulares (hepatócitos):

- a- Confirmar a superexpressão da Notch1 em hepatócitos;
- b- Avaliar o efeito da superexpressão da Notch1 em proteínas envolvidas na gliconeogênese;
- c- Analisar o conteúdo proteico de moléculas reguladoras da lipogênese;
- d- Verificar o efeito da inibição do complexo γ -secretase no acúmulo de lipídeos.

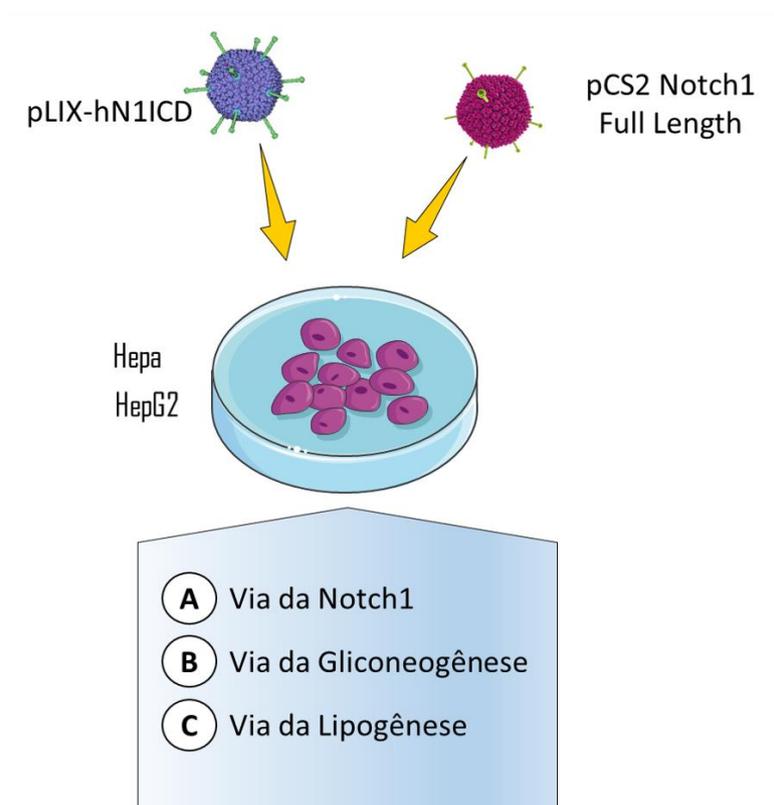


Figura 6. Etapa 5 do projeto. Verificar o efeito da superexpressão da Notch1 em hepatócitos

MATERIAIS E MÉTODO

ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss com seis semanas de idade provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno individuais sob condições controladas de ciclo claro-escuro (12/12h), com livre acesso a água e ração comercial ou hiperlipídica (CINTRA et al., 2012). A tabela 1 representa a composição da dieta hiperlipídica utilizada para indução da obesidade. Os camundongos foram divididos em 3 grupos: Controle (CTL – expostos a dieta comercial), Obeso Sedentário (OBS - submetidos a uma dieta hiperlipídica até o fim do período experimental) e Obeso Exercício (OBT - submetidos tanto a dieta hiperlipídica como ao treinamento físico por 4 semanas).

Além disso, foi utilizado também camundongos ob/ob (ob/ob, deficientes de leptina) e seus respectivos controles (C57BL/6J), todos provenientes do CEMIB. Estes animais foram selecionados randomicamente e distribuídos nos grupos experimentais como previamente descrito. Entretanto, esse modelo experimental não recebeu dieta hiperlipídica.

Todos os experimentos com animais 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 e devidamente aprovados (4853-1/2018 e 5583-1/2020).

Ingredientes	g
Amido (Q.S.P.)	115,5
Caseina	200
Amido de milho dextrinizado	132
Sacarose	100
óleo de soja	40
banha	312
celulose	50
mix de minerais	35
mix de vitaminas	10
L-cistina	3
Bitartarato de colina	2,5
Total	1000

Tabela 1. Dieta hiperlipídica. (Q.S.P.) – Amido adicionado em Quantidade Suficiente Para – completar 1000 g de dieta. Dieta foi modificada para conter 35% de lipídios (312 g de banha + 40 g de óleo de soja).

PROTOCOLO DE ADAPTAÇÃO À ESTEIRA ROLANTE

Os animais foram submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbio com duração de quatro semanas. Inicialmente os camundongos foram adaptados à esteira rolante, a fim de minimizar o estresse do animal perante o ergômetro. Os animais foram adaptados por 5 dias, 10 min/dia na velocidade de 3 m/min, conforme padronizado por Ferreira e colaboradores (2007) (FERREIRA et al., 2007).

PROTOCOLO DE CARGA INCREMENTAL

O teste de carga incremental foi realizado após dois dias da realização do período de adaptação. A velocidade inicial do teste foi de 6 m/min, com 0% de inclinação e incrementos de 3 m/min a cada 3 min até a exaustão voluntária dos camundongos, que ocorreu quando os animais encostaram 5 vezes no final da esteira, no intervalo de 1 min. A velocidade de exaustão (VE), definida como a velocidade (m/min) de exaustão do animal, foi utilizada para a prescrição de intensidade no protocolo de exercício físico agudo e para o exercício físico

crônico. Após dois dias da realização do teste incremental, o protocolo de exercício físico crônico foi realizado.

PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO

Durante a primeira semana de treinamento físico o volume foi aumentado gradativamente, porém a intensidade adota para o treinamento foi de 70% da VE. Cada semana experimental foi composta por 5 dias consecutivos de treinamento e 2 dias de repouso. A primeira semana os animais correram por 30 minutos diários. A segunda os animais passaram a correr 45 minutos. Posteriormente, o volume aumentou para 60 minutos por dia. Após a terceira semana, os animais foram submetidos novamente ao teste de carga incremental, a fim de reajustar as adaptações geradas pelo exercício frente a intensidade. Posteriormente, a quarta semana, os animais foram submetidos a 60 minutos por dia de corrida, com a intensidade de 70% da VE adquirida no segundo teste. Após 24 horas a realização da última sessão de exercício físico, fragmentos de fígado foram removidos para futuras análises.

TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG)

Após 8 horas de jejum, foi realizado corte distal na cauda dos animais 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 TTG foram determinados com o glicosímetro Accu-Check Active® (Roche, *Switzerland*).

TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (TTI)

A glicemia de jejum foi mensurada após 8 horas de jejum, por meio de um corte distal na cauda dos camundongos. Logo após, foi aplicado insulina i.p. na concentração de 1,5 U/Kg de peso. A glicemia foi verificada nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min por meio do glicosímetro.

A constante de decaimento (Ktti) foi calculada conforme descrito por Muñoz et al. (2020) (MUÑOZ et al., 2020).

TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (TTP)

O teste de tolerância ao piruvato foi realizado para estimar a gliconeogênese, percorrendo os seguintes passos. Os camundongos permaneceram em jejum por 12 horas, e depois receberam injeção intraperitoneal de piruvato (2g/kg) dissolvido em salina (Sigma[®]-Aldrich, St Louis, MO, USA). Os níveis de glicose sanguínea foram coletados através da cauda dos animais a cada 30 minutos durante 2 horas usando um glicosímetro.

INGESTÃO ALIMENTAR

A ingestão alimentar dos grupos dos grupos experimentais foi medida após 6, 12, 18 e 24 horas após o protocolo de exercício físico. A medição do peso foi feita usando balança analítica (Gehaka[®], BK3000).

EUTANÁSIA, EXTRAÇÃO TECIDUAL, COLETA DE SANGUE E ANÁLISE SÉRICA

Os animais foram eutanasiados por meio de profundamento da anestesia, cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg). Após isso, foi realizada a abertura da cavidade abdominal e extração de fragmentos do tecido hepático e do tecido adiposo visceral. O tecido hepático foi homogeneizado em tampão de extração como descrito por Gaspar e colaboradores (2018) enquanto o tecido adiposo foi retirado e pesado em balança analítica (Gehaka[®], BK3000) para comparação entre os grupos. (GASPAR et al., 2018). Parte deste homogenato foi utilizado para determinação do conteúdo das proteínas totais através do método do Bicinchoninic Acid (BCA) (Sigma-Aldrich[®]), enquanto a outra parte foi submetida à western blotting (WB) com anticorpos específicos. O sangue foi coletado e centrifugado a 3500 rpm por 15min e o soro foi armazenado em freezer a -80°C. Posteriormente, as concentrações de insulina, triacilgliceróis e ácidos graxos séricos foram analisados utilizando os kits específicos. Para a análise do índice de HOMA-IR, foi utilizado o cálculo $HOMA-IR = Glicemia \times Insulina \div 22,5$ (GELONEZE;

TAMBASCIA, 2006). Foi utilizado os reagentes Laborlab® para as análises séricas: ALT (1770150), AST (1770140), Colesterol (1770080), HDL (1770160), LDL (1770370) e Triglicérides (1770290).

TRIGLICÉRIDES HEPÁTICO

Fregmentos do tecido hepático hepáticos foram homogeneizados com tampão clorofórmio: metanol 2: 1 frio (v / v). As amostras foram então misturadas com ácido sulfúrico (1 M) e centrifugadas para obter a separação de fases. A fase orgânica foi coletada e após a evaporação, as amostras foram ressuspensas em álcool isopropílico (Synth®). As concentrações de triglicérides foi medido pelo reagente Triglicérides-Laborlab®.

WESTERN BLOTTING

Após a determinação do conteúdo de proteínas totais, foi acrescentado tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970) contendo 100 mM de DTT ao sobrenadante, e então aquecido por 5 minutos. Em seguida, quantidades iguais de proteínas (70 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram incubadas overnight a 4°C usando os anticorpos específicos. Os anticorpos utilizados foram: Cell signaling®: Notch1 (#3608); Presilinina 1 (#3622); Cleaved Notch1-Val1744 (#4147); CPT1A (#12252); β-Actin (#4967); GAPDH (#2118); α-tubulin (#2144s); p-4E-BP1 thr37/46 (#2855); 4E-BP1 (#9452); p-mTOR s2448 (#5536); mTOR (#2983); p-Raptor s792 (#2083); Raptor (#2280); FoXO1 (#2880s). Santacruz®: PCB (#sc-271493); G6Pase (#sc-25840). ABCAM®: OXPHOS (#ab110413). BIOOS®: SREBP-1/2 (#bs-1402r). LSBio®: PCK2/PEPCK (#LS-C178341). As bandas foram visualizadas com enhanced chemiluminescence (ECL) e quantificadas por densitometria.

EXTRAÇÃO NUCLEAR

A expressão nuclear da proteína FoxO1, NICD e Rbpj foram obtidas através de fragmentos do tecido hepático dos diferentes grupos experimentais. Os fragmentos do fígado foram homogeneizados em tampão STE (0.32 M sacarose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM

EDTA, 1 mM DTT, 100 mM fluoreto de sódio, 100 mM pirofosfato de sódio, 10 mM ortovanadato de sódio, 1 mM PMSF, e 0.1 mg aprotinina/ml). O homogenato foi centrifugado (1,000xg, 25 min, 4°C) para a obtenção dos pellets. Os pellets foram lavados uma vez e suspensos em tampão STE (fração nuclear). A fração nuclear foi solubilizada em tampão Triton [1% (v/v) Triton X-100/150 mM NaCl/10 mM Tris/HCl (pH 7,4) /1 mM EGTA/1 mM EDTA/0.2 mM ortovanadato de sódio /20 µM leupeptina A/0,2 mM PMSF/50 mM NaF/0.4 nM microcistina LR]. A fração foi centrifugada (15,000 g, 30 min, 4°C), e o sobrenadante (extrato nuclear) foi armazenado a -80°C. Em seguida foi utilizada a técnica de Western Blotting para análise da expressão nuclear das proteínas de interesse no fígado.

REAL TIME PCR QUANTITATIVO (RT-QPCR)

Fragmentos do fígado foram extraídos e homogeneizados em Trizol®. O RNA total foi isolado de acordo com as recomendações do fabricante. 1 µg de RNA foi usado para a síntese de cDNA, com sistema de pré- amplificação (*High-Capacity Reverse-transcription, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Os primers que foram utilizados serão específicos para os genes descritos nos objetivos. A PCR em tempo real foi realizada com *primers* de oligonucleotídeos específicos *forward* e *reverse* em um volume final de 10 µL com *SYBR Green PCR Master Mix (#4309155, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*. O experimento foi realizado no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems)*. A tabela 2 representa a lista de primers utilizado no presente estudo.

Lista de Primers		
Genes Alvos	Sentido	Sequências
<i>Notch1</i>	Reversed (5' – 3')	CACATTCGGCACTGTTACAGCC
	Forward (3' – 5')	GCTGCCTCTTTGATGGCTTCGA
<i>RBPJ</i>	Reversed (5' – 3')	GTGGAGTTGTGATACAGGGTCG
	Forward (3' – 5')	TGGCTACATCCATTACGGGCAG
<i>Hey1</i>	Reversed (5' – 3')	CTGCTTCTCAAAGGCACTGGGT
	Forward (3' – 5')	CCAACGACATCGTCCCAGGTTT
<i>Hes1</i>	Reversed (5' – 3')	GAAGCGGGTCACCTCGTTCATG
	Forward (3' – 5')	GGAAATGACTGTGAAGCACCTCC
<i>Presinilina 1</i>	Reversed (5' – 3')	AGAACACGAGCCCGAAGGTGAT
	Forward (3' – 5')	GAGACTGGAACACAACCATAGCC
<i>Presinilina 2</i>	Reversed (5' – 3')	TTCTCTCTGGGCAGTTCCAC
	Forward (3' – 5')	CTGGTTCATCAAGTACCTGCC
<i>PEN2</i>	Reversed (5' – 3')	TGAAGGAGAGGTAGTCCCAAG
	Forward (3' – 5')	GCCTACACAGAGCAGAGCCAAA
<i>Nicastrin</i>	Reversed (5' – 3')	GCTGAAGTTGGTTCCTCTGCA
	Forward (3' – 5')	GTGACCTATCCTGAGTGGCAGA
<i>Aph1a</i>	Reversed (5' – 3')	TTCCGCTCACTCAGTGATGC
	Forward (3' – 5')	GCCTCCTGATTTTGGTGCTGC
<i>Aph1b</i>	Reversed (5' – 3')	GGTGCTGTCTCCTCAGGGTTTA
	Forward (3' – 5')	CCTGCTCATCTTCGGAGTGTTG
<i>Aph1c</i>	Reversed (5' – 3')	CCAAGGAGTTAGACAGGGGTTC
	Forward (3' – 5')	CCTGCTCATCTTCGGAGTGTTG
<i>PEPCK</i>	Reversed (5' – 3')	CTTAAGTTGCCTTGGGCATCA
	Forward (3' – 5')	AGAAGAAATACCTGGCCGCA
<i>G6Pase</i>	Reversed (5' – 3')	CGTTCAAACACCGGAATCCA
	Forward (3' – 5')	GCGCAGCAGGTGTATACTATG
<i>PCB</i>	Reversed (5' – 3')	TCAGCATCATTAGTGTTCAGC
	Forward (3' – 5')	AAGTTTGGTTGCGCGGAG
<i>GAPDH</i>	Reversed (5' – 3')	ACACAT TGGGGGTAGGAACA
	Forward (3' – 5')	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
<i>β-Actina</i>	Reversed (5' – 3')	TCATCCATGGCGAACTGGTG
	Forward (3' – 5')	TGTCGAGTCGCGTCCA

Tabela 2. A tabela 2 representa os primers utilizados para análise de (RT-QPCR).

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA NOTCH1

O inibidor foi adquirido da empresa Cayman Chemical®. Os animais receberam a injeção intraperitoneal de DAPT (10 mg/kg), inibidor de γ -secretase, trinta minutos antes da extração tecidual, a fim de induzir a diminuição da clivagem de Notch1. Os animais controles receberam a mesma dose, porém foi administrado de DMSO (JIANG et al., 2017).

ISOLAMENTO MITOCONDRIAL

O tecido hepático dos animais anestesiados foi rapidamente extraído e colocado em placa de Petri com 8ml de tampão de isolamento mitocondrial gelado (220mM Manitol, 70mM Sacarose, 10mM TRIS, 1mM EDTA e pH ajustado para 7,4 com KOH) e cortado em pequenos pedaços, de acordo com Von Schulze et al. 2018 (VON SCHULZE et al., 2018). O conteúdo foi transferido para tubo de 15 ml e homogeneizado com pistão de Teflon. O homogenato foi então transferido para um tubo cônico de 50 ml e centrifugado (4°C, 10 min, 1500g). Uma porção de 500uL do sobrenadante foi reservado para análise proteica ao final do experimento e o restante do sobrenadante foi transferido para um Falcon de 15ml com o fundo arredondado e centrifugado (4°C, 10min, 8000g). O pellet foi então ressuspensão em 4mL de tampão de isolamento mitocondrial contendo 0,1% de BSA livre de ácidos graxos realizando processo de “*Up and down*” cuidadosamente com a micropipeta e centrifugado (4°C, 10min, 4000g). O pellet final do processo de isolamento mitocondrial foi ressuspensão em 500uL de MIR05 (100mM Sacarose, 60mM K + Lactobionico, 0,5mM EGTA, 3mM MgCl₂, 20mM Taurina, 10mM KH₂ PO₄, 20mM HEPES e pH ajustado para 7,1 com KOH e adição de 1g/L de BSA). O conteúdo proteico das amostras foi determinado pelo ensaio de Bradford.

RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL

O consumo de oxigênio mitocondrial (pmol s⁻¹ mL⁻¹) foi determinado utilizando o Oroboros O2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria), e analisado no DatLab 7 (Oroboros Instruments). Após a calibração, 200ul do isolado mitocondrial foi adicionado a câmara e em seguida os substratos para análise da atividade de oxidação de ácidos graxos (FAO), Complexo I (CI) e Complexo II (CII). Todas as análises de respiração mitocondrial foram realizadas com a câmara em 37 °C em meio Mir05 em um volume total de 2 mL por câmara. O protocolo de titulação de substratos foi adaptado do protocolo SUIT17 descrito em <https://wiki.orooboros.at/index.php/SUIT-017>. As titulações ocorreram da seguinte forma (em concentração final em 2mL): Malato (0,5mM), Octanoylcarnitina (0,2mM), ADP (2.5mM), Glutamato (10mM), Succinato (10mM) e ADP (5mM). O estímulo da via de oxidação de ácidos graxos foi feito pelo estímulo por Malato e Octanoylcarnitina e a adição de ADP permite

ativação da via de fosforilação oxidativa utilizando ácidos graxos como substrato. Em seguida o complexo I é estimulado com adição de Glutamato e a atividade do complexo II com adição de Succinato. Por fim, a segunda adição de ADP estimula novamente a via de fosforilação oxidativa agora na presença de substratos do complexo I e II.

HISTOLOGIA: EOSINA E HEMATOXILINA

Um fragmento do fígado foi extraído para histologia e em seguida foi colocado em um tubo cônico com paraformaldeído 4%. Após 24 horas de submersão em paraformaldeído 4%, as amostras foram lavadas em água corrente e foram armazenadas em álcool etílico 70%. Os tecidos foram banhados, por uma hora, em álcool em diferentes concentrações (80%, 95% e 100%), xilol, e parafina. Posteriormente, os tecidos foram incluídos em blocos de parafina, e cortados com uma espessura de 4,0 μm e fixados em lâminas de microscopia. Por fim, for utilizado os corantes de eosina e hematoxilina a fim de verificar a estruturação tecidual.

CULTURA DE CÉLULAS E TRATAMENTOS

Linhagens celulares HepG2 e Hepa foram cultivadas em DMEM e suplementadas com 10% (v/v) soro fetal bovino (SFB) e 1% penicilina estreptomicina. As células foram cultivadas a 37 ° C sob uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As sequências do gene da Notch1 foram derivadas do plasmídeo pLIX-hN1ICD (Fig. 7A - plasmídeo original Addgene #91897), que expressa o domínio intracelular sob o controle de um promotor induzível com tetraciclina, e pCS2 Notch1 Full Length-6MT (Fig. 7B - plasmídeo original Addgene #41728), que expressa a proteína Notch1 completa sob o controle de um promotor constitutivo. A preparação dos plasmídeos foi realizada utilizando o Qiagen endofree maxi-prep kit e os plasmídeos foram transfectados em culturas de células utilizando lipofectamina (Thermo). A superexpressão do grupo pLIX foi induzido por tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Além disso, para o experimento com HepG2, as células foram tratadas com palmitato 100 μM e DAPT 20 μM , a fim de medir a concentração lipídica pelo corante *oilred*. As células foram lavadas com PBS e então fixadas com 10% formaldeído por 30 min. A próxima etapa foi realizar a coloração com *oilred* por 15

minutos. Em seguida, as células foram lavadas com água deionizada, e as fotos foram adquiridas para o meio com microscópio óptico (LAB2000, LABORANA®, São Paulo, Brasil) com Moticam Pro 282B 5.0 megapixels (Motic®, Hong Kong, China). Para a análise de lipídios intracelulares, as células com isopropanol 100% durante 10 min e então as amostras foram aplicadas em uma placa para leitura da absorbância.

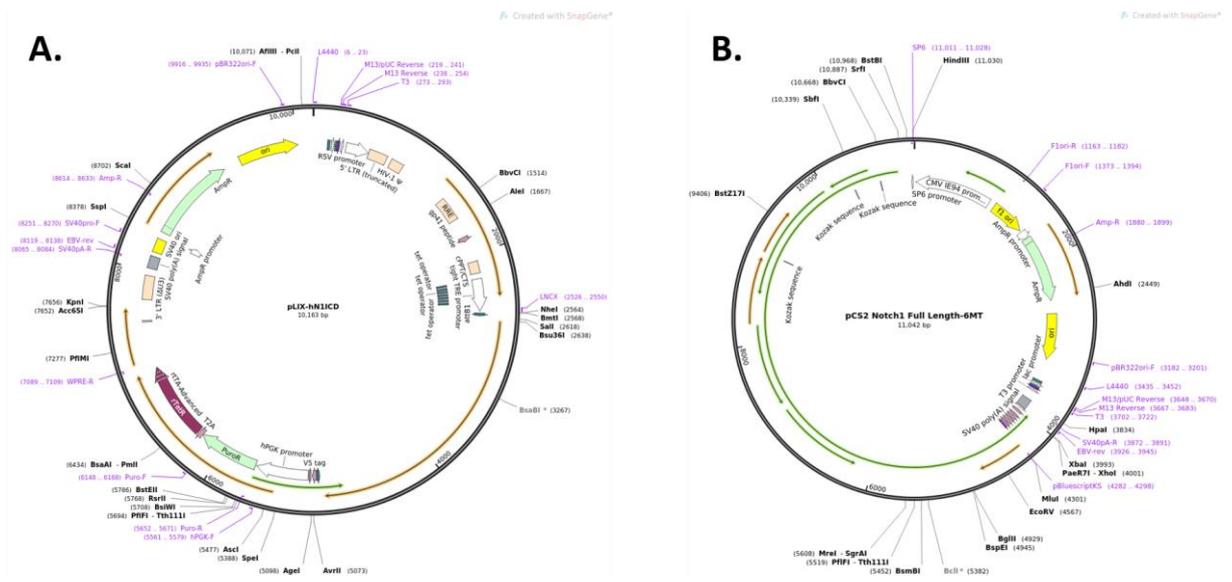


Figura 7. Sequências do gene da Notch1 foram derivadas do plasmídeo pLIX-hN1ICD (www.addgene.org/91897/) e pCS2 Notch1 Full Length-6MT (www.addgene.org/41728/).

ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando comparado dois grupos, foi usando o teste t de *Student* (normal) ou Teste de Mann-Whitney (não normal). Quando comparado três grupos, a análise de variação - teste ANOVA one-way (normal) seguido de post-hoc de Tukey ou Kruskal-Wallis (não normal) foi adotado. Os dados expressos em gráficos de dispersão, foram avaliados pelo teste ANOVA two-way. Os resultados de Western Blotting foram apresentados e quantificados por densitometria usando o programa Un-Scan-It Gel 6.1® e normalizados pelo respectivo controle endógeno. A significância

estatística foi definida em $p < 0,05$ como estatisticamente significativa. O programa "GraphPad Prism 8.0.1 foi utilizado para as análises estatísticas bem como para as construções dos gráficos.

RESULTADOS

DIETA RICA EM GORDURA SATURADA INDUZ INTOLERÂNCIA AO PIRUVATO

Inicialmente, verificou-se que a distribuição randomizada dos camundongos nos diferentes grupos experimentais não apresentou diferença na massa corporal inicial (Fig. 8A), no entanto, após o protocolo de indução de obesidade (8 semanas), antes da intervenção do treinamento físico, os animais alimentados com uma dieta rica em gordura saturada (OBS e OBT) apresentaram aumento massa corporal quando comparados ao grupo alimentado com dieta padrão (Fig. 8B). Observou-se ainda, que os animais obesos apresentaram aumento na glicemia de jejum e intolerância ao piruvato após a indução a obesidade em relação aos animais CTL (Fig. 8C-E).

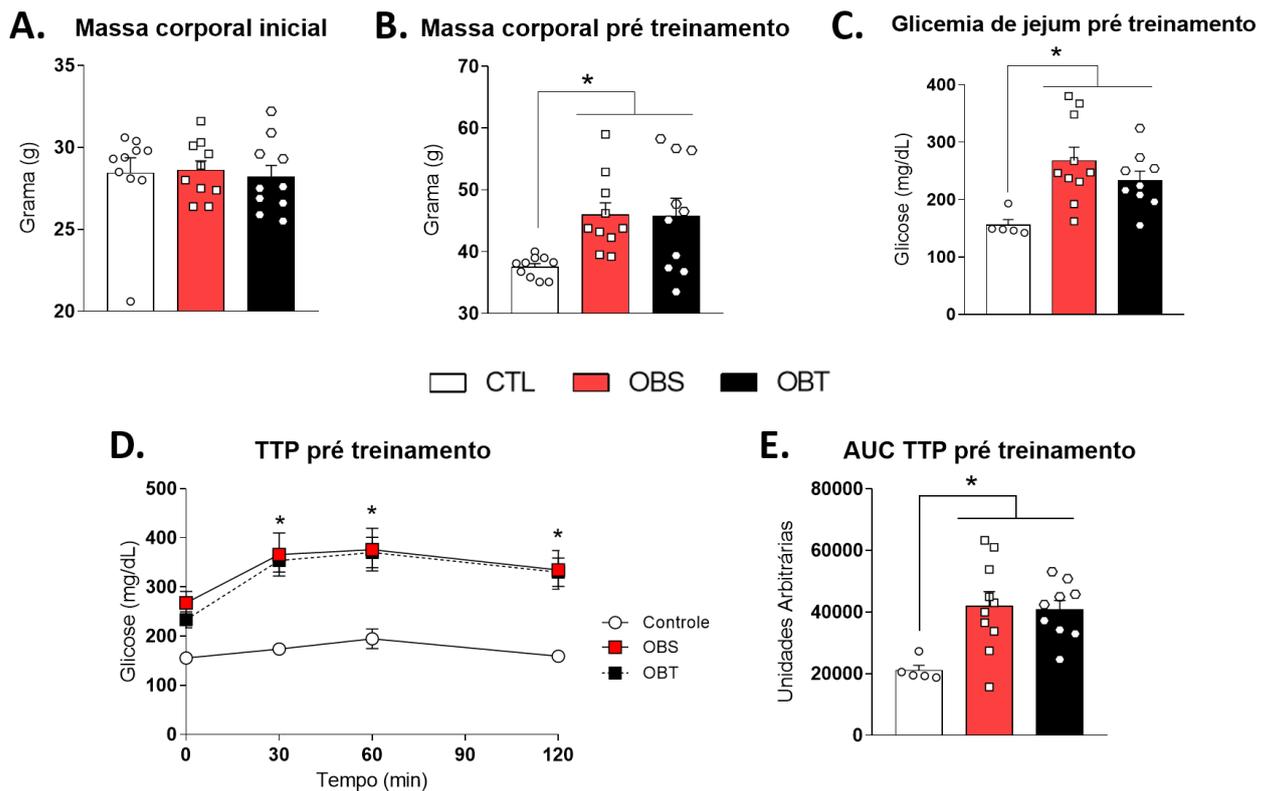


Figura 8. Indução a obesidade. (A) Massa corporal inicial dos diferentes grupos durante as semanas experimentais. (B) Massa corporal final pré-treinamento. (C) Glicemia de jejum, (D) teste de tolerância ao piruvato e (E) AUC do teste TTP. Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com $p < 0.05$, sendo * \neq de CTL e # \neq OBS.

TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO MELHORA A PERFORMANCE NO PROTOCOLO DE CARGA INCREMENTAL

Com o fim da etapa de indução a obesidade, realizou-se o protocolo de carga incremental a fim de encontrar a intensidade individual de cada animal para o treinamento físico. Assim, após 3 semanas de treinamento, notou-se um aumento da velocidade de exaustão pós treinamento (Fig. 9A) bem como exaustão, na qual avaliamos a influência do peso sob a VE (Fig. 9B). Ademais, observou-se uma maior distância percorrida dos animais no segundo teste (pós) quando comparados ao teste inicial (pré), sugerindo uma melhora na performance de corrida gerada pelo treinamento (Fig. 9C).

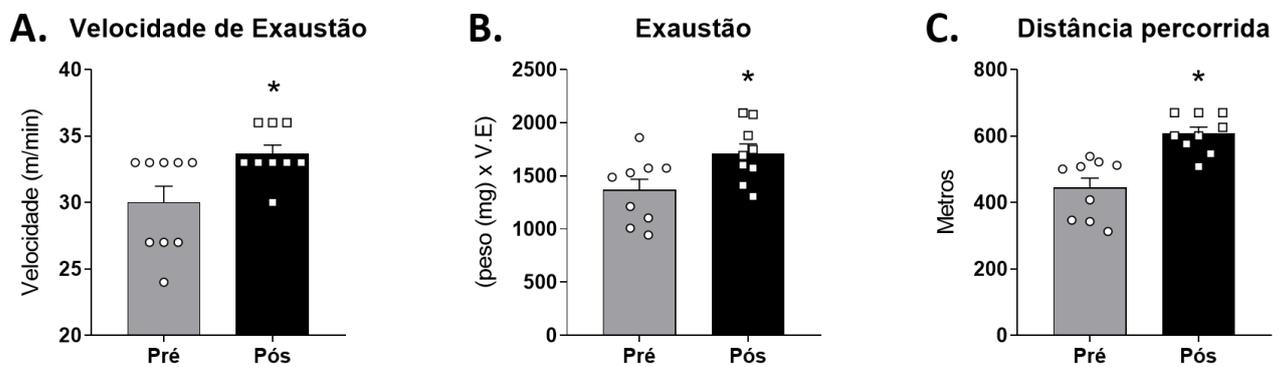


Figura 9. Protocolo de carga incremental. (A) Velocidade de exaustão. (B) Exaustão em relação a massa corporal. (C) Distância percorrida. Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com $p < 0.05$, sendo * \neq de pré-treinamento.

TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO REDUZ ADIPOSIDADE, MAS NÃO A INGESTÃO ALIMENTAR EM CAMUNDONGOS OBESOS

No final das 4 semanas de corrida em esteira não foi encontrado alterações na massa corporal final quando comparados apenas os grupos que receberam dieta hiperlipídica, porém ambos os grupos apresentaram aumento da massa corporal quando comparados ao grupo CTL (Fig. 10A-B). Por outro lado, observou-se uma redução na adiposidade dos animais treinados, onde os camundongos OBT apresentaram uma redução no tecido adiposo mesentérico e epididimal, quando comparados ao grupo OBS (Fig. 10C). Ademais, não foi verificado

diferenças significativas entre os grupos na ingestão de alimentar durante o período de 24 horas de análise, apenas no tempo 6 horas os animais OBS apresentaram uma ingestão alimentar maior quando comparados ao grupo CTL (Fig. 10D-E).

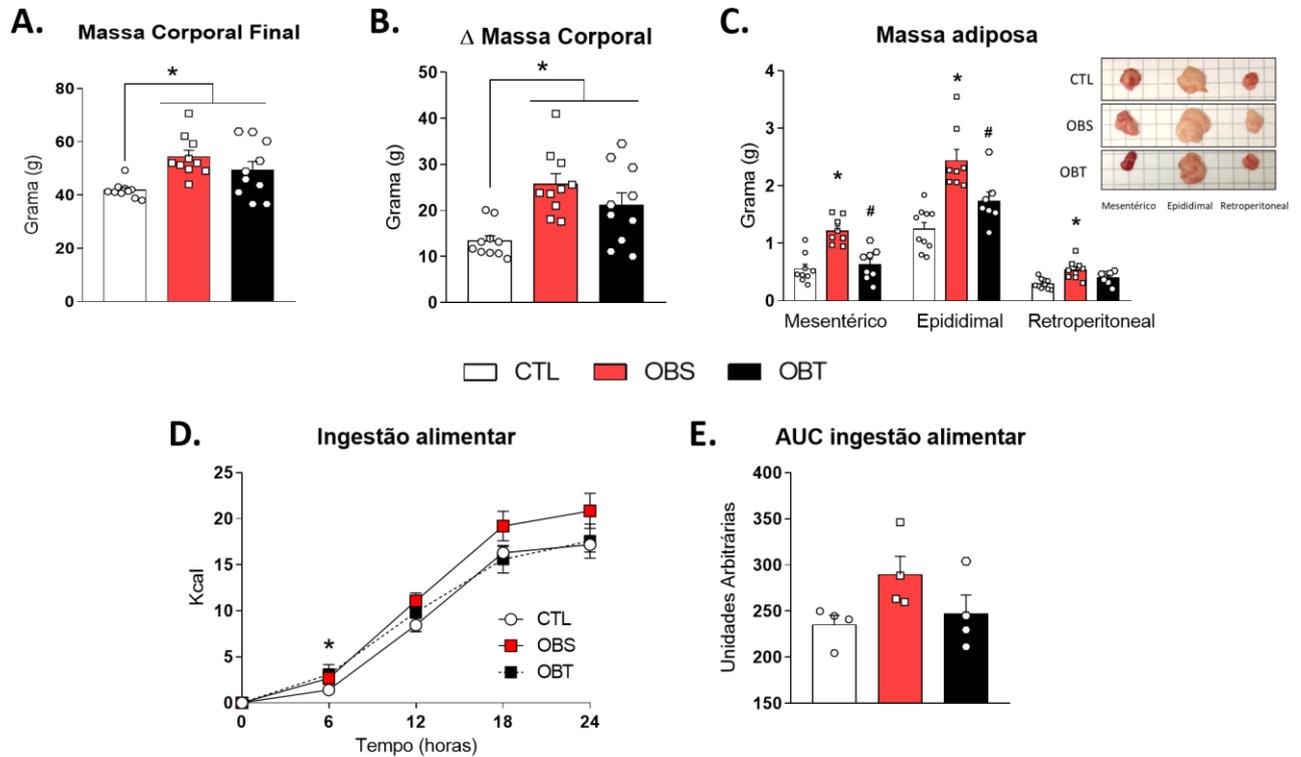


Figura 10. (A) Massa corporal final. (B) delta da massa corporal. (C) Massa adiposa. (D) Ingestão alimentar e (E) AUC da ingestão. Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com $p < 0.05$, sendo * \neq de CTL e # \neq OBS.

EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO MELHORA O PERFIL LIPÍDICO DE CAMUNDONGOS OBESOS

Apesar de não encontrar diferenças na massa corporal e adiposa entre os grupos obesos, o grupo OBT demonstrou um menor TAG sérico em comparação com os demais grupos experimentais. Os animais treinados atenuaram a elevação nos níveis séricos de colesterol total e LDL promovidos pela obesidade (Fig. 11A e 11C). Verificou-se que os animais obesos sedentários apresentaram menor concentração sérica de HDL quando comparados aos animais controles (Fig. 11B). Ainda, os animais que realizaram o exercício físico mostraram uma tendência de redução de β -Hidroxibutirado ($p=0.05$) em comparação aos animais CTL (Fig.

11D). Além disso, observou-se que os animais obesos apresentaram aumento nos níveis alanina aminotransferase (ALT) e o exercício físico preveniu essa alteração (Fig. 11E). Não houve diferenças nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) (Fig. 11F).

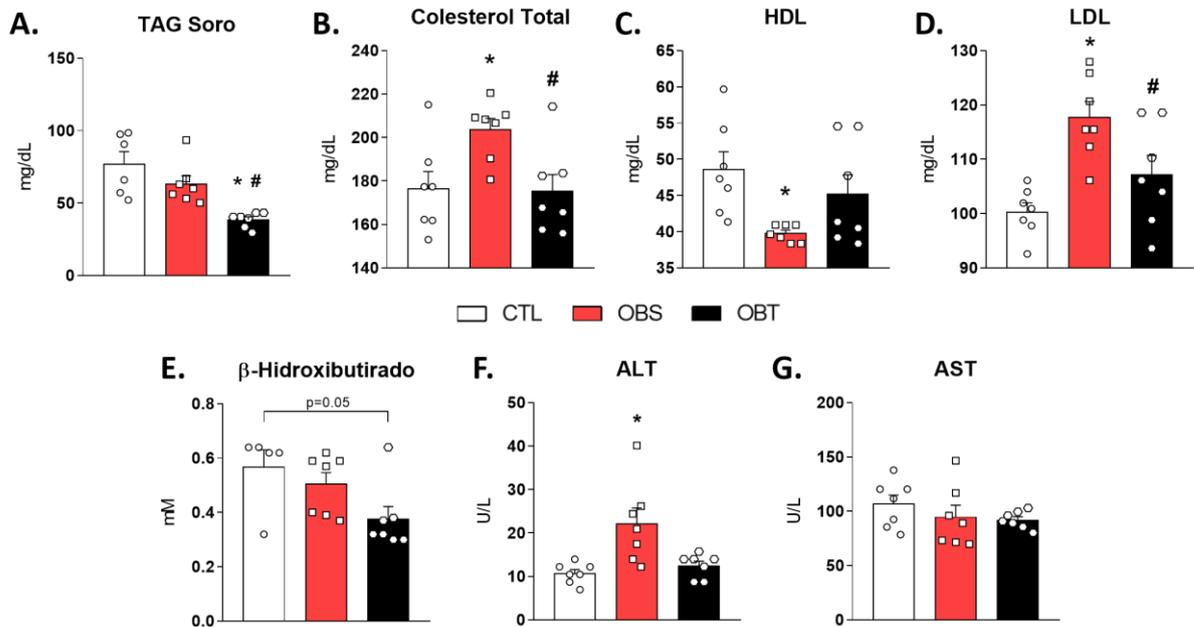


Figura 11. Perfil lipídico e enzimas hepáticas. (A) TAG soro. (B) Colesterol total. (C) HDL. (D) LDL. (E) β-Hidroxiacetil-CoA. (F) ALT e (G) AST. Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com $p < 0.05$, sendo * ≠ de CTL e # ≠ OBS.

EXERCÍCIO FÍSICO AUMENTA A TOLERÂNCIA À GLICOSE E A SENSIBILIDADE À INSULINA

Com a melhora do perfil lipídico, examinamos a homeostase glicêmica dos diferentes grupos experimentais. Foi possível observar que os animais OBS apresentaram aumento significativo na glicemia (Fig. 12A), mas não na insulina de jejum quando comparados ao grupo CTL (Fig. 12B). Por outro lado, os animais submetidos ao protocolo de exercício reduziram a glicemia e a insulina de jejum (Fig. 12A e 12B), e apresentaram tendência de redução na resistência à insulina ($p = 0.08$), identificada pelo teste HOMA-IR (Fig. 12C). Por meio do teste TTG, o exercício físico mostrou-se capaz de atenuar a intolerância a glicose (Fig. 12D e 12E) assim como a sensibilidade à insulina quando comparados aos animais OBS (Fig. 12F e 12G).

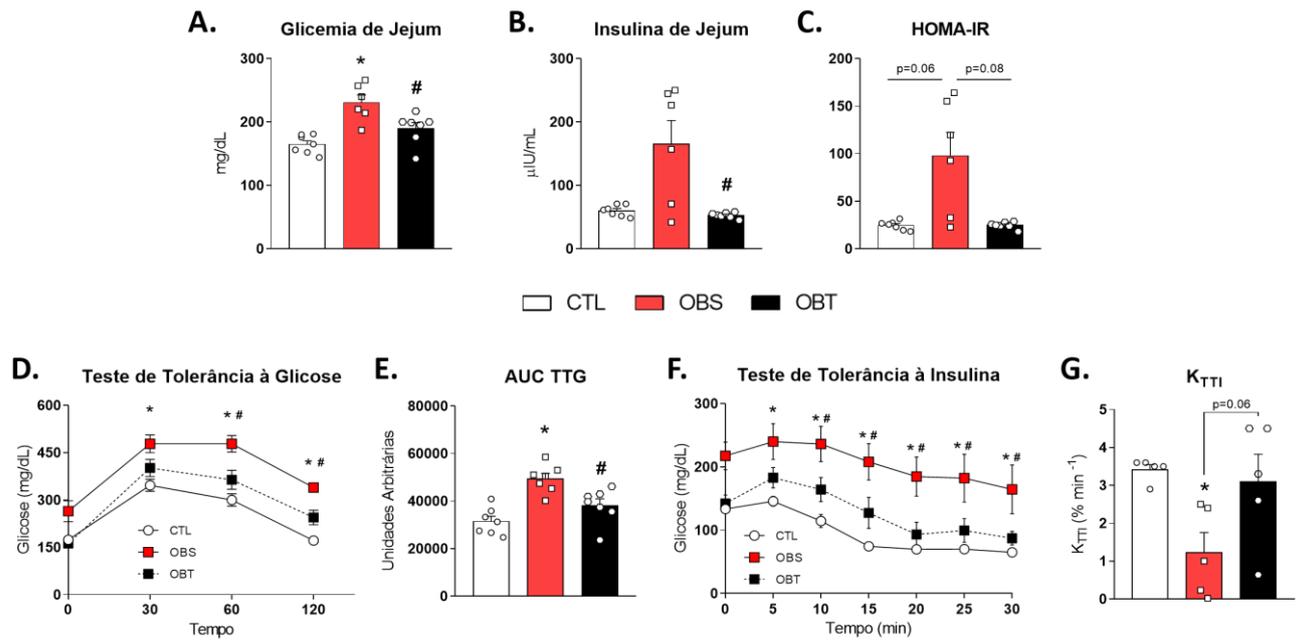


Figura 12. Homeostase glicêmica. (A) Glicemia de jejum. (B) Insulina de jejum. (C) HOMA-IR. (D) Teste de tolerância à glicose e (E) AUC do TTG. (F) Teste de tolerância à insulina e (G) taxa de decaimento da glicose (K_{TTI}). Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com $p < 0.05$, sendo * \neq de CTL e # \neq OBS.

SINALIZAÇÃO DA NOTCH1 HEPÁTICA É SUPRIMIDA PELO EXERCÍCIO FÍSICO

Do ponto de vista molecular, encontramos que a obesidade promoveu um aumento significativo no conteúdo proteico total de Notch1 e do domínio intracelular NICD em comparação aos animais controle (Fig. 13A e 13B). Além disso, ao analisarmos o conteúdo proteico nuclear, identificou-se que houve um aumento significativo nos níveis proteicos de NICD, RBPJ e FoxO1 nos animais obesos sedentários em relação aos animais controle (Fig. 13D-F). Enquanto isso, os animais exercitados apresentaram redução significativa na concentração total de proteínas Notch1 e NICD bem como da proteína Presinilina-1, proteína associada ao complexo γ -secretase (Fig. 13A-C). Ainda, as análises do conteúdo proteico do núcleo revelaram que os animais OBT revertem os elevados níveis NICD (Fig. 13) e também apresentaram uma tendência de redução ($p=0.05$) de FoxO1 nuclear (Fig. 13C) promovidos pela obesidade. Uma vez estabelecido os efeitos no conteúdo proteico, o próximo passo foi examinar

o conteúdo de RNA mensageiro das proteínas envolvidas na sinalização da Notch1. Assim, não foi identificado diferenças significativas nos níveis de RNAm da *Notch1*, porém a obesidade resultou no aumento de *RBPJ* e de *Hes1* em relação ao grupo CTL (Fig. 13G). Por fim, analisamos o conteúdo de RNAm das proteínas que compõem o complexo γ -secretase. Os animais do OBS exibiram elevação nos níveis de RNAm da *Presinilina-1* e *Presinilina-2* ($p=0.05$), enquanto os animais treinados reduziram o conteúdo de *Presinilina-1* e apresentaram uma tendência de diminuição de *PEN2* ($p=0.07$) quando comparados ao grupo OBS (Fig. 13H). Ademais, os animais OBT apresentaram uma redução significativa na expressão de *Nicastrin* quando comparado aos demais grupos e também se notou um aumento significativo no conteúdo de *APH1c* em relação ao grupo OBS (Fig 10H).

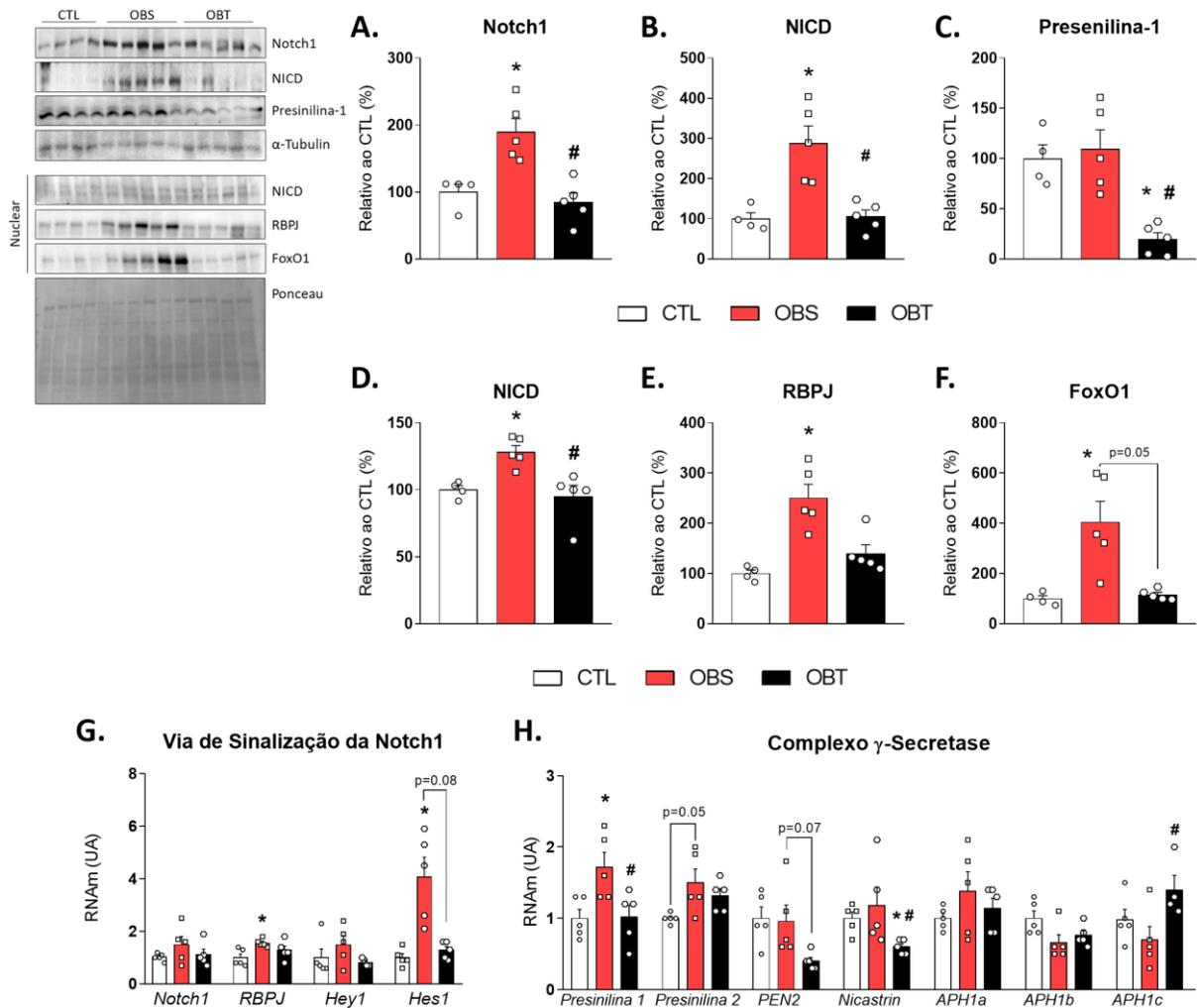


Figura 13. Via de sinalização da Notch1. Foram avaliados o conteúdo proteico de (A) Notch1, (B) NICD e (C) Presenilina-1. Além disso, foi mensurado o conteúdo proteico nuclear de (D) NICD, (E) RBPJ e (F) FoxO1. Por fim, os níveis de RNAm das proteínas da (G) via da Notch1 e do (H) complexo γ -secretase. Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com $p < 0.05$, sendo * \neq de CTL e # \neq OBS.

TREINAMENTO AERÓBIO REDUZ A GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA EM CAMUNDONGOS OBESOS

Estabelecido os efeitos moleculares promovidos pelo exercício na sinalização da Notch1 no fígado, a próxima etapa foi verificar se essas alterações apresentam algum impacto nas vias reguladas pela Notch1, como a produção hepática de glicose. Portanto, verificou-se que os animais do grupo OBS mostraram uma intolerância ao piruvato maior em relação ao grupo CTL, enquanto os animais OBT apresentaram-se mais tolerantes quando comparados ao grupo OBS (Fig. 14A-B). Apesar disso, não foi possível observar alterações na expressão gênica de enzimas da gliconeogênese nos animais obesos sedentários em comparação com o grupo CTL (Fig. 14C). Contudo, os animais exercitados exibiram uma redução nos níveis de RNAm de *G6Pase* quando comparados ao grupo CTL (Fig. 14C). Nenhuma diferença foi encontrada em relação ao conteúdo de RNAm de *PEPCK* e *PCB* entre os grupos (Fig. 14C). Ademais, o conteúdo proteico de G6Pase mostrou-se aumentado nos animais OBS quando comprados ao grupo CTL (Fig. 14D). No entanto, o treinamento físico foi capaz de reduzir a concentração proteico de G6Pase, PEPCK e PCB em comparação com os OBS (Fig. 14E).

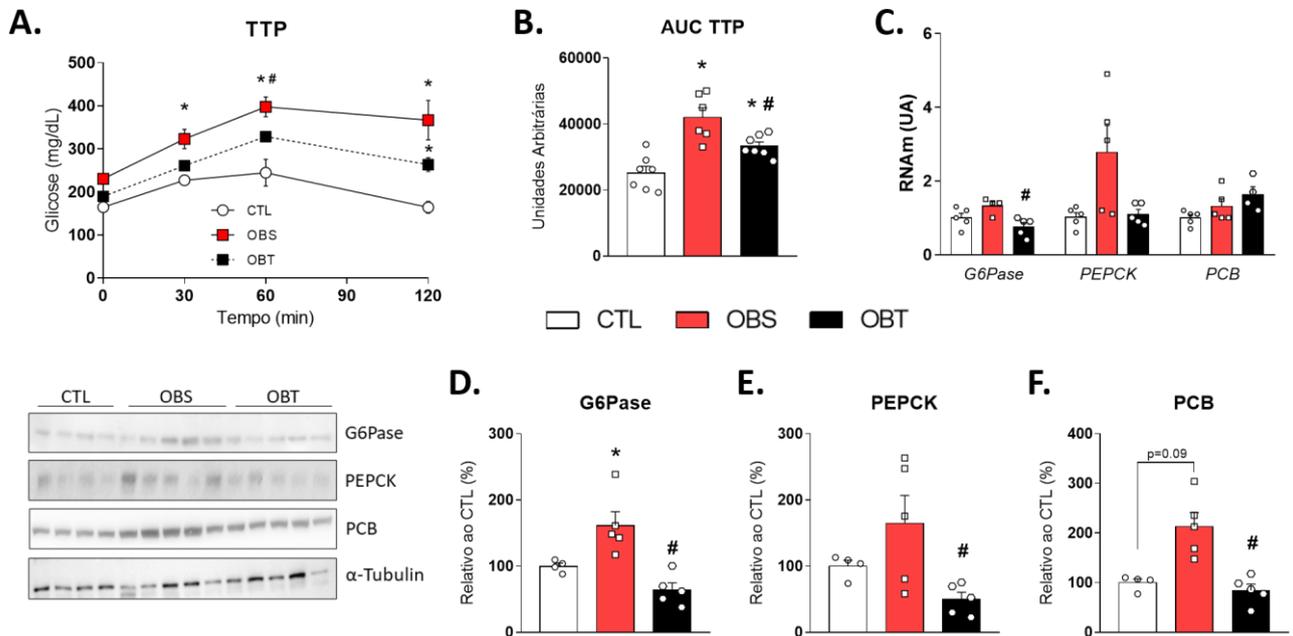


Figura 14. Gliconeogênese hepática. (A) Teste de tolerância ao piruvato e (B) área sob a curva do TTP. (C) Conteúdo de RNAm das proteínas da gliconeogênese. Conteúdo proteico de (D) G6Pase, (E) PEPCK e (F) PCB. Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com $p < 0.05$, sendo * \neq de CTL e # \neq OBS.

TREINAMENTO AERÓBIO REDUZ O ACÚMULO DE LIPÍDEOS HEPÁTICO EM CAMUNDONGOS OBESOS

Além do controle na gliconeogênese, a Notch1 exibe uma ação na regulação da lipogênese hepática, por meio da ativação de mTOR. Aqui, não se observou alteração na fosforilação de proteínas associadas ao complexo mTORC1 nos animais OBS, porém, o grupo OBS apresentou aumento no conteúdo proteico de SREBP-1C, importante marcador lipogênico, em relação ao grupo CTL (Fig. 15D). Por outro lado, o treinamento físico mostrou-se eficiente em reduzir a fosforilação das proteínas mTOR e Raptor (Fig. 15A e 15B), bem como reduzir os níveis proteicos de SREBP-1C (Fig. 15D). Corroborando com as alterações moleculares, foi possível observar uma redução no acúmulo de lipídeos nos animais OBT em comparação com OBS, além dos animais OBS também apresentarem uma concentração maior de lipídeos hepático em relação ao grupo CTL (Fig. 15E e 15F).

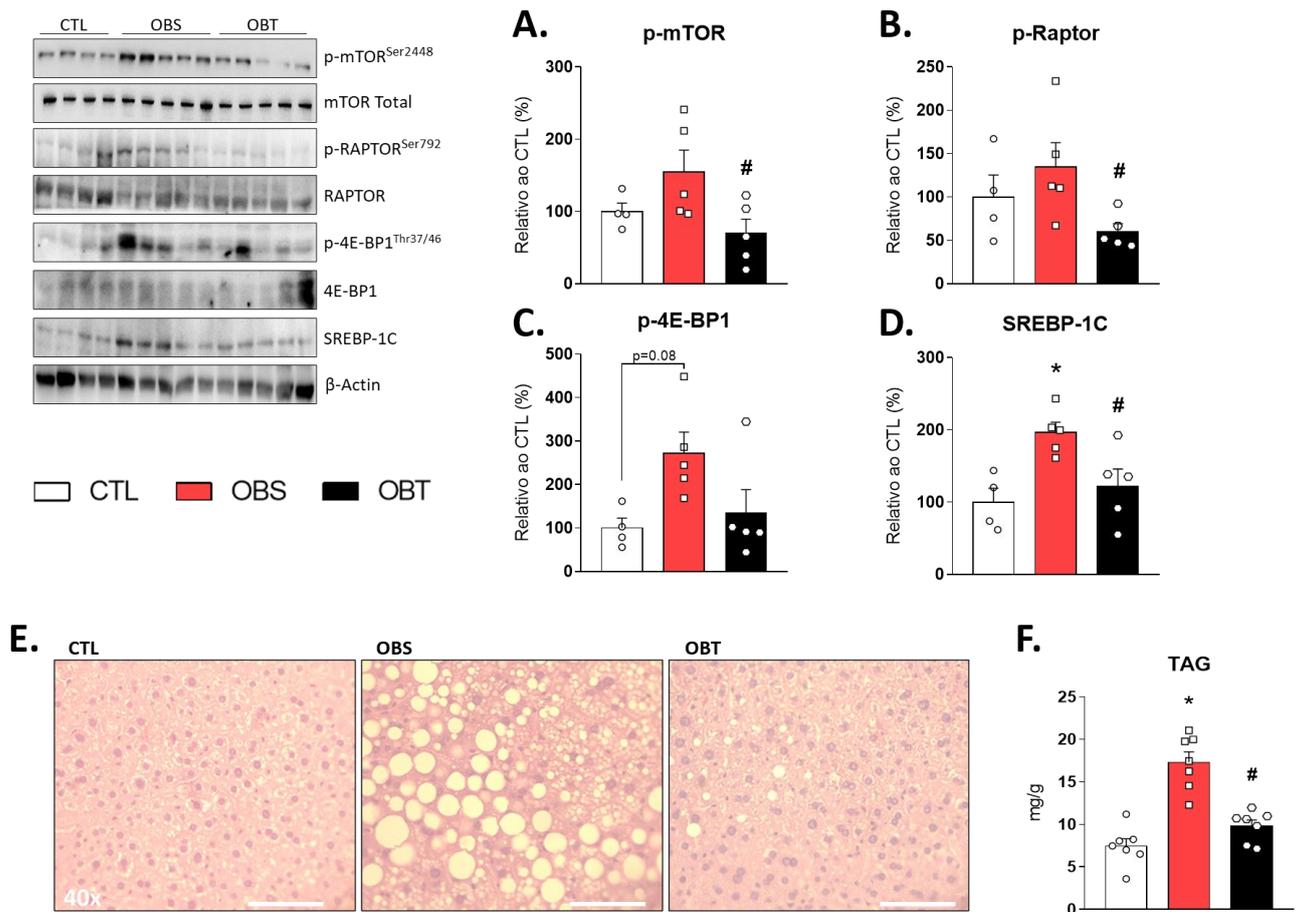


Figura 15. Lipogênese hepática. Conteúdo proteico de (A) p-mTOR, (B) p-Raptor, (C) p-4E-BP1 e (D) SREBP-1C. (E) H&E e (F) TAG do do tecido hepático. Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com análise com $p < 0.05$, sendo * \neq de CTL e # \neq OBS.

EXERCÍCIO FÍSICO RESTABELECE RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS OBESOS

Verificou-se ainda, por meio do isolamento de mitocôndrias do fígado dos diferentes grupos (Fig. 16A), que os animais OBS apresentaram uma redução na respiração mitocondrial quando comparados ao grupo CTL (Fig. 16B). Contudo, os animais exercitados, apresentaram maior respiração mitocondrial quando estimulados com glutamato, succinato e ADP (Fig. 16B). Em seguida, nós analisamos as proteínas pertencentes a fosforilação oxidativa (OXPHOS) (Fig. 16C). Verificamos que os animais OBT apresentaram aumento do transportador CPT1A quando comparados ao grupo OBS (Fig. 16D). Entretanto, não se observou nenhuma diferença significativa nas proteínas associadas ao complexo OXPHOS entre os grupos, apenas uma

tendência de redução no conteúdo proteico de ATP5A ($p=0.06$) nos animais OBS em comparação ao grupo CTL (Fig. 16E).

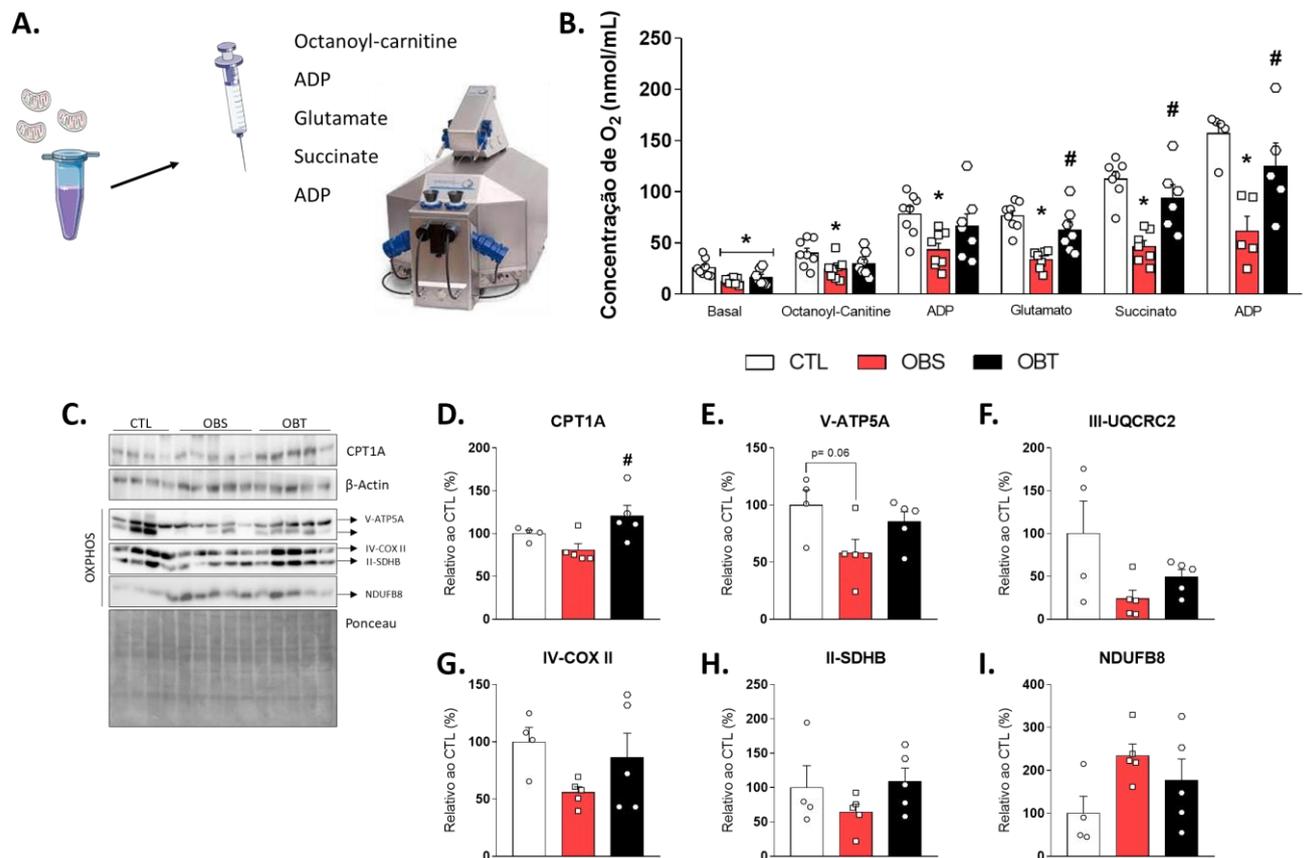


Figura 16. Respiração mitocondrial. (A) esquema ilustrativo, (B) respiração mitocondrial analisada pelo equipamento OROBOROS®. (C) Análise molecular do tecido hepático de: (D) CPT1A (E) V-ATP5A, (F) III-UQCRC2, (G) IV-COX II, (H) II-SDHB, (I) NDUFB8. Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com $p < 0.05$, sendo * \neq de CTL e # \neq OBS.

INIBIÇÃO DO COMPLEXO GAMA-SECRETASE MELHORA TOLERÂNCIA AO PIRUVATO E A GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA

A fim de confirmar se as alterações promovidas associadas a redução da Notch1 em camundongos obesos, verificou-se que a injeção de DAPT, inibidor de γ -secretase, promoveu uma redução glicêmica após 30 minutos durante o teste de tolerância ao piruvato (Fig. 17A). Além disso, foi possível identificar uma redução na área sob a curva do teste TTP dos animais que receberam o inibidor quando comparados aos animais controle obeso (Fig. 17B). Em seguida, identificou-se que após 30 minutos da injeção de DAPT, o conteúdo proteico de NICD (Fig. 17C) e das proteínas da via gliconeogênese, PEPCK e G6Pase, encontraram-se reduzidos (Fig. 17D e 17E), estabelecendo assim uma relação entre a via da Notch1 e a produção hepática de glicose. Por fim, notou-se que o uma tendencia em reduzir SREBP-1C ($p=0.07$) nos animais que receberam o inibidor quando comprados ao grupo controle (Fig. 17F).

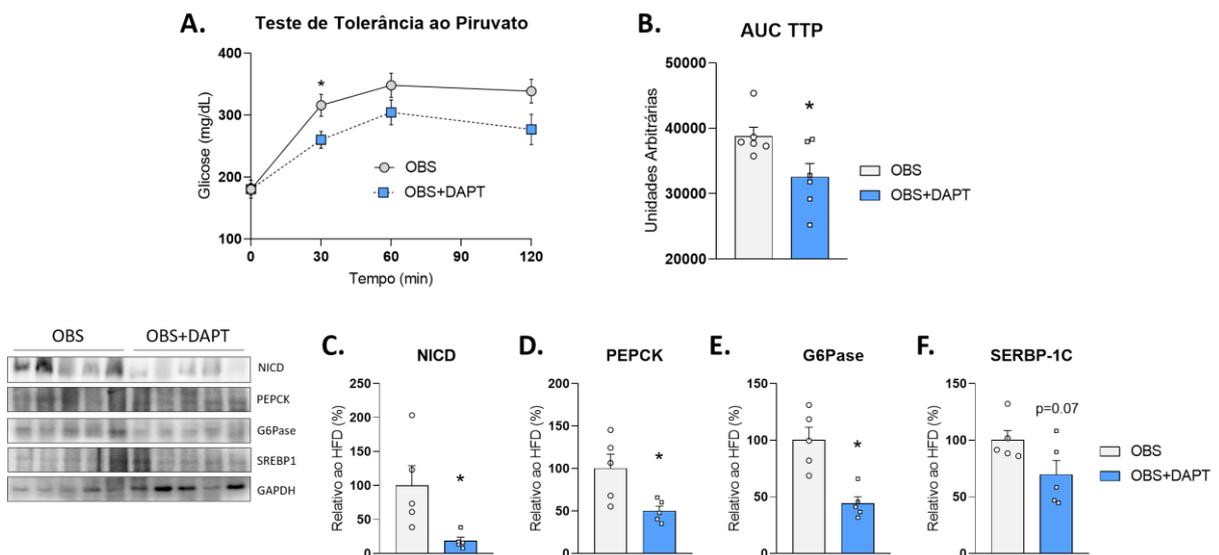


Figura 17. Inibição do complexo γ -secretase. (A) Teste de tolerância ao piruvato e (B) área sob curva do TTP. (C) Conteúdo proteico de NICD, (D) PEPCK, (E) G6Pase e (F) SREBP-1C. Os resultados foram estatisticamente diferentes com $p<0.05$, sendo * \neq de OBS.

EXERCÍCIO FÍSICO REDUZ ATIVAÇÃO DE NOTCH1 NO FÍGADO DE CAMUNDONGOS OB/OB

A etapa seguinte foi observar o efeito do exercício físico aeróbio em camundongos obesos, ob/ob, que são camundongos que desenvolvem a obesidade devido à ausência de leptina. Assim, verificou-se que os animais obesos sedentários se mostraram intolerantes ao piruvato, enquanto os animais obesos exercitados apresentaram redução nos níveis glicêmicos durante o TTP e uma tendência de redução da área sob a curva do teste (Fig. 18B e 18C). Além disso, os animais ObSed apresentaram aumento da glicemia e da insulina de jejum quando comparados aos animais magros e conseqüentemente resistência à insulina (Fig. 18D-F). Por outro lado, apesar de verificar uma redução na glicemia de jejum nos animais ObExe (Fig. 18D), nenhuma redução na insulina de jejum e no HOMA-IR foi encontrado (Fig. 18E e 18F). Não obstante, os animais ObSed apresentaram uma tendência de aumento nos níveis séricos de TAG ($p=0.06$), enquanto os animais ObExe apresentaram uma redução, não significativa ($p=0.05$) quando comparados aos animais obesos sedentários (Fig. 18G). Ainda, os animais ObSed apresentaram aumento nos níveis de ALT quando comparados aos animais CTL (Fig. 18H) e nenhuma uma diferença significativa foi observada nos níveis de AST nos diferentes grupos experimentais (Fig. 18I). Do ponto de vista molecular, notou-se que os animais ObSed aumentou o conteúdo proteico de NICD comparado ao grupo CTL, enquanto e os exercitados apresentaram uma redução de NICD em relação ao grupo ObSed (Fig. 18J). Ademais, os animais ObSed apresentaram uma tendência de aumento nas concentrações proteicas de PEPCK e SREBP-1C ($p=0.05$ e $p=0.06$, respectivamente) quando comparados ao grupo CTL (Fig. 18K e 18L). O exercício físico, por sua vez, preveniu o aumento dos níveis de PEPCK e SREBP-1C, em relação aos animais ObSed, porém não houve diferenças significativas (Fig. 18K e 18L). Nenhuma diferença foi observada nos níveis de CPT1A CTL (Fig. 18M). Identificou-se ainda, que os animais ObSed obtiveram um maior acúmulo de lipídeos no fígado em relação aos animais controles, enquanto os animais treinados conseguiram reduzir as concentrações de gotículas lipídicas, mas não de forma significativa (Fig. 18N e 18O).

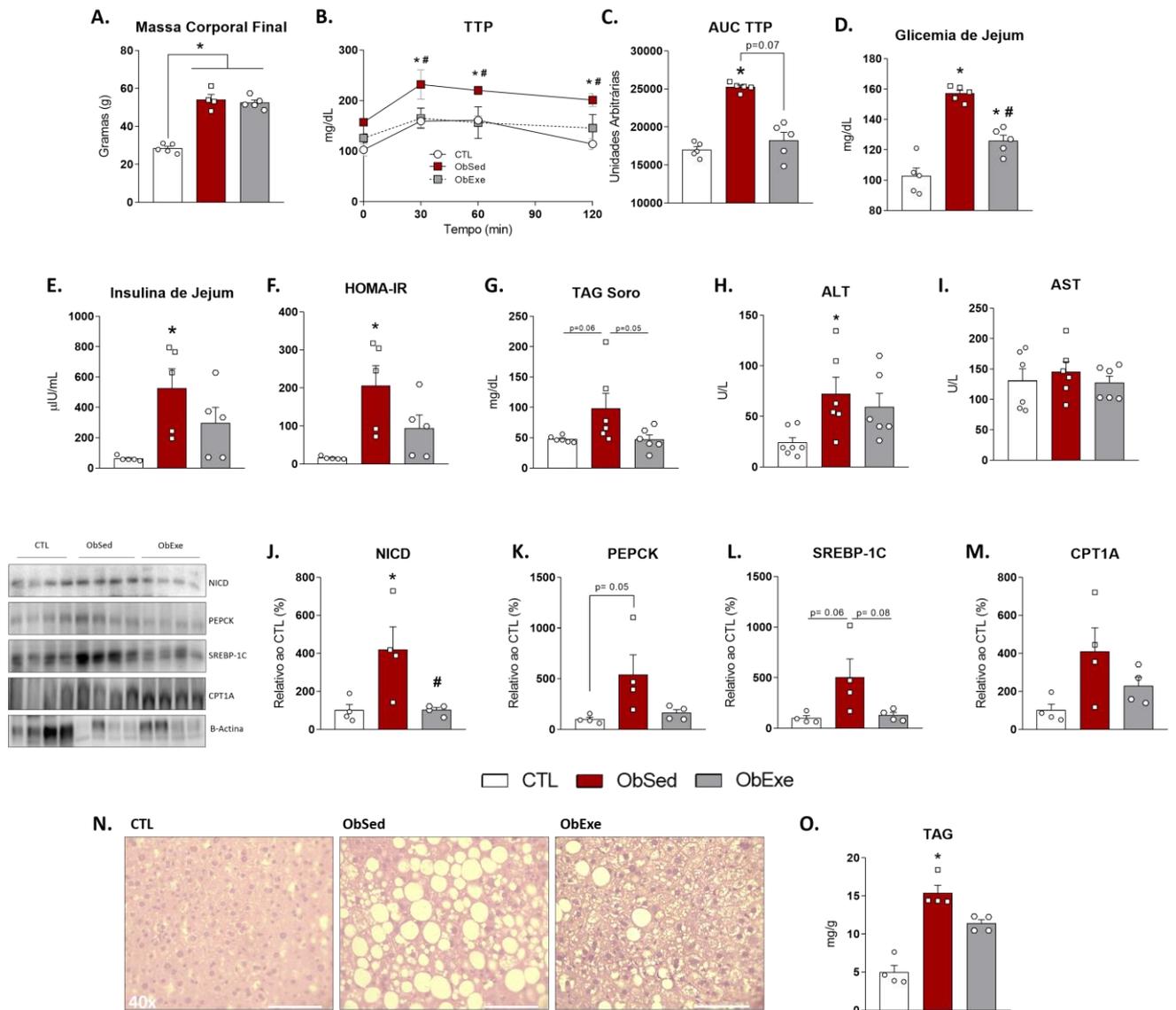


Figura 18. Análises com animais obob. Foi verificado (A) massa corporal final, (B) teste de tolerância ao piruvato, (C) AUC do teste TTP, (D) glicemia de jejum, (E) insulina de jejum e (F) HOMA-IR. (G) TAG soro, (H) ALT e (I) AST. Foi mensurado o conteúdo proteico de (J) NICD, (K) PEPCK, (L) SREBP-1C e (M) CPT1A. (N) H&E e (O) TAG no tecido hepático. Os resultados foram estatisticamente diferentes de acordo com análise com $p < 0.05$, sendo * \neq de CTL e # \neq ObSed.

SUPEREXPRESSÃO DA NOTCH1 AUMENTA PEPCK E SREBP-1C EM CÉLULAS HEPA

Com o intuito de confirmar o efeito da Notch1 diretamente nos hepatócitos, foi realizado a superexpressão da Notch1 *Full Length* assim como a superexpressão do domínio intracelular

da Notch1 em linhagem celular Hepa, originadas de tecido hepático de camundongos. Dessa maneira, foi possível identificar que a superexpressão de Notch1 resultou em aumento nos níveis proteicos de PEPCK e SREBP-1C, mas não no conteúdo proteico de FAS (Fig. 19A). Acompanhado os dados anteriores, ao superexpressar o NICD, identificou-se uma tendência em aumentar os níveis proteicos de PEPCK e SREBP-1C ($p=0.06$), porém não houve diferença no conteúdo proteico de FAS (Fig. 19B).

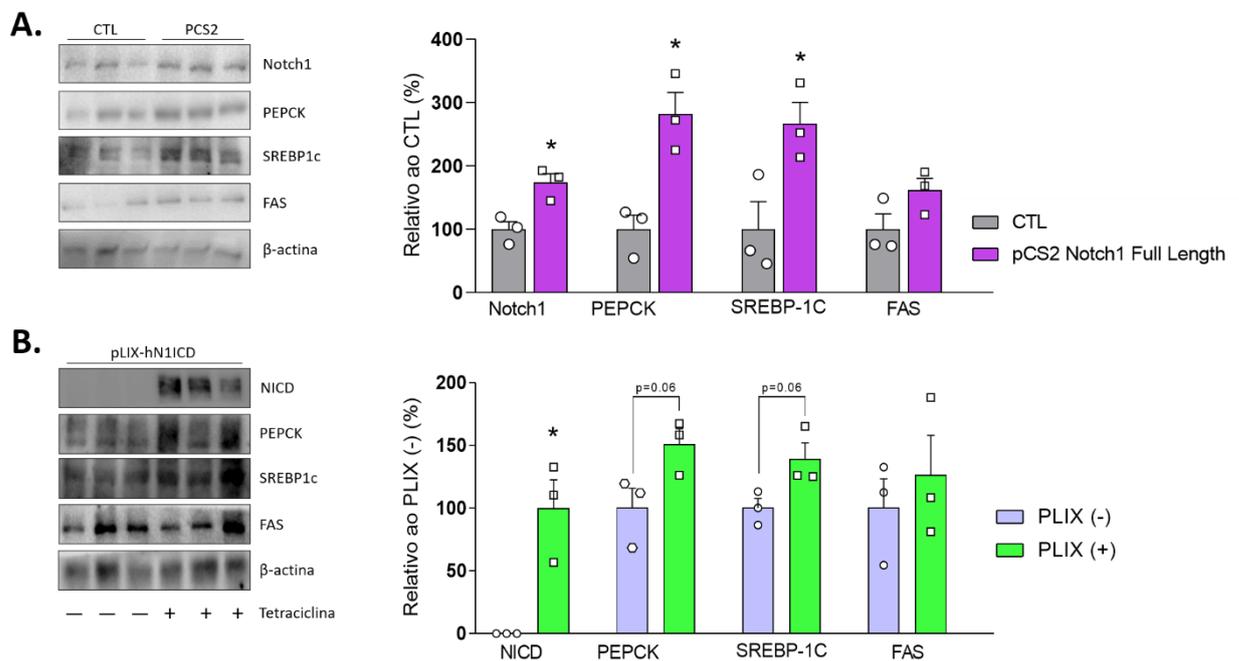


Figura 19. Superexpressão da Notch1 Full Length (pCS2) e de NICD (pLIX-hN1CD) em células Hepa. (A) conteúdo proteico de Notch1, PEPCK, SREBP-1C e FAS após superexpressão da Notch1. (B) conteúdo proteico de Notch1, PEPCK, SREBP-1C e FAS após superexpressão do NICD. Os resultados foram estatisticamente diferentes $p<0.05$, sendo * \neq de seus respectivos controles.

INIBIÇÃO DO COMPLEXO GAMA SECRETASE NÃO REDUZIU O ACÚMULO DE LIPÍDEOS EM CELULAS HEPG2

Por fim, a fim de verificar o efeito da atividade da Notch1 na lipogênese hepática, utilizou-se palmitato para induzir o acúmulo de lipídeos e mimetizar um ambiente

obesogênico. Assim, na figura 20A e 20B foi possível identificar que o tratamento com palmitato aumentou o acúmulo de lipídeos quando comparados ao grupo controle e com o grupo tratado apenas com DAPT após 48 horas de tratamento. No entanto, quando as células foram tratadas com palmitato e o inibidor DAPT, não foi encontrado nenhum efeito protetor, mas sim uma tendência de aumento das concentrações lipídicas nessas células, quando comparados aos demais grupos controle e DAPT (Fig. 20A e 20B).

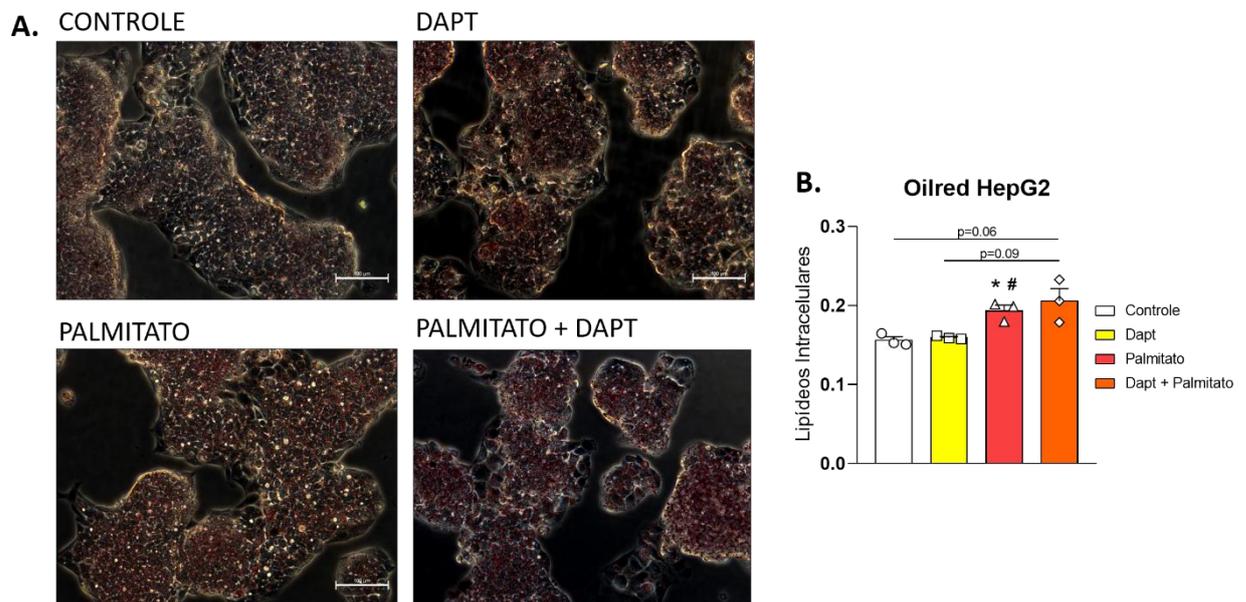


Figura 20. Células HepG2 foram tratadas com DAPT 20 μ M e palmitato 100 μ M por 48 horas, sem o período de *starvation*. (A) imagens das células após coloração com o corante *oilred*. (B) Quantificação dos lipídeos intracelulares. Os resultados foram estatisticamente diferentes $p < 0.05$, sendo * \neq controle e # \neq DAPT.

DISCUSSÃO

A Notch1 tem sido um alvo de estudo no metabolismo hepático devido a sua ação no controle da gliconeogênese e lipogênese (BI; KUANG, 2015). No presente estudo observou-se que o treinamento físico aeróbio foi eficiente em reduzir a produção hepática de glicose bem como o acúmulo de lipídeos no fígado de animais obesos. Do ponto de vista molecular, indentificou-se que a obesidade induziu um aumento no conteúdo proteico de Notch1 bem como de NICD, forma ativa da Notch1, e outras proteínas associadas a essa via. De forma inédita, demonstrou-se aqui que o exercício físico foi eficaz em reverter a elevação na sinalização da Notch1 no tecido hepático de animais obesos. Posteriormente, verificou-se que o exercício possibilitou uma menor expressão e conteúdo proteico de enzimas chaves no processo de gliconeogênese da lipogênese hepática. Interessantemente, resultados similares foram observados em animais ob/ob. Ainda, o exercício físico foi capaz de aumentar a respiração mitocondrial, sugerindo um aumento na oxidação lipídica hepática. A inibição do complexo γ -secretase, principal mecanismo de clivagem da Notch1 repercutiu em uma menor área sob a curva no TTP nos animais que receberam o inibidor DAPT quando comparados ao controle, além do que o inibidor reduziu de forma significativa o conteúdo proteico de NICD bem como PEPCK e G6Pase. Por fim, a superexpressão de Notch1 em hepátitos resultou em aumento das enzimas gliconeogênicas bem como de SREBP-1C, confirmando os resultados *in vivo*. Toamdos em conjunto, nossos resultados evidenciam os efeitos prejudiciais do aumento de Notch1 sobre o metabolismo hepático com a obesidade e ao contrário, o efeito inibitório do exercício nessa via de sinalização.

Os desarranjos metabólicos promovidos pela obesidade impactam diretamente a homeostase glicêmica, tornando-a um dos maiores fatores de risco para o desenvolvimento do DM2 (RODEN; SHULMAN, 2019). A gliconeogênese hepática representa aproximadamente 90% da produção endógeno de glicose, propiciando a manutenção da homeostase glicêmica (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). Nesse sentido, um dos mecanismos mais conhecidos na supressão de PHG é a sinalização da insulina. Após o reconhecimento da insulina, o IR propaga o sinal intracelular da via até a fosforilação da Akt, que por sua vez é capaz de promover a extrusão da FoxO1 do núcleo celular, através da fosforilação do sítio

serina²⁵⁶. Fora do núcleo, a FoxO1 torna-se incapaz de promover a expressão das enzimas-chaves no processo de gliconeogênese, como a PEPCK e G6Pase (PAJVANI; ACCILI, 2015). Quando há interferências na sinalização da FoxO1, através de sua superexpressão ou inibição, observa-se alterações na gliconeogênese hepática em decorrência da expressão de G6Pase e PEPCK (QU et al., 2006; SAMUEL et al., 2006). Como encontrado em estudos prévios (ARAÚJO et al., 2007; GU et al., 2019), foi possível detectar que o nosso modelo de obesidade gerou aumento no conteúdo proteico das enzimas pertencentes a gliconeogênese e encontramos uma presença maior de FoxO1 no núcleo celular dos animais OBS quando comparados ao grupo CTL, corroborando com os dados do teste de tolerância ao piruvato. Não obstante, verificou-se que o treinamento físico atenuou as desordens hepáticas ocasionadas pela obesidade, melhorando a intolerância ao piruvato e reduzindo o conteúdo proteico de PEPCK, G6Pase e PCB, conforme observado por estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa e de outros grupos (KNUDSEN et al., 2016; MARINHO et al., 2012; MUÑOZ et al., 2017). Além disso, observou-se que os animais ob/ob reduziram a intolerância ao piruvato bem como reduziu os níveis proteicos de PEPCK. Vale ressaltar, que benéficos observados aqui, não parecem ser exclusivos do treinamento aeróbio, estudos recentes têm demonstrado os efeitos do treinamento de força na modulação do metabolismo hepático e na produção hepática de glicose (PEREIRA et al., 2019, 2020). Deste modo, o treinamento físico tem-se tornado um potencial intervenção não farmacológica no combate as desordens metabólicas.

Apesar de bem descrita a participação da insulina no controle da PHG, ainda se debate os mecanismos associados ao controle da gliconeogênese hepática. Curiosamente, Buettner e colaboradores (2005), verificaram que a inibição do IR, por meio da injeção de oligonucleotídeos antisense (ASO), foi eficiente em prejudicar a via de sinalização da insulina, mas não foi capaz de interferir na supressão da gliconeogênese mediado pela insulina (BUETTNER et al., 2005). Nessa mesma perspectiva, Dong e colaboradores (2008) revelaram que a deleção específica de IRS1 e IRS2 no tecido hepático não interferiu na ativação da FoxO1 hepática (DONG et al., 2008). Tais achados aventam a hipótese que mecanismos independentes possam regular a atividade da FoxO1 assim como a produção hepática de glicose independente da sinalização da insulina. Dessa maneira, a Notch1 mostra-se uma via promissora no

metabolismo hepático, visto que o domínio NICD é capaz de associar-se a FoxO1 no núcleo e impedir que esse fator de transcrição deixe o núcleo da célula, favorecendo a transcrição de genes associados a gliconeogênese (BI; KUANG, 2015). No entanto, a ação da Nocth1 no controle da produção de glicose pelo fígado apresenta resultados conflitantes (BERNSMEIER et al., 2016; PAJVANI et al., 2011). Apesar de desenhos experimentais diferentes, os nossos achados corroboram com os resultados obtidos no elegante trabalho conduzido por Pajvani e colaboradores (2011), onde verificou-se que a exacerbação na produção hepática de glicose pode estar associada com os aumentos nos níveis de Notch1 e FoxO1 (PAJVANI et al., 2011). O *knockout* de Notch1 e FoxO1 no fígado refletiu na supressão da gliconeogênese (PAJVANI et al., 2011). Além disso, Song e colaboradores (2016) mostraram que camundongos obesos induzidos por dieta, assim como o presente estudo, apresentaram aumento no conteúdo proteico de Notch1, no entanto, nós não detectamos elevação nos níveis de RNAm de Notch1 assim como os autores apontaram (SONG et al., 2016). Por fim, análises realizadas em pacientes com obesidade mórbida, revelaram que os produtos da ativação da Notch1 (Hes1 e Hey1) hepática se correlacionaram positivamente com a resistência à insulina bem como PEPCCK e G6Pase (VALENTI et al., 2013).

Diante da relevância na Notch1 no metabolismo hepático e o impacto do descontrole da homeostase glicêmica na vida dos pacientes acometidos por distúrbios metabólicos, postulamos que o exercício físico poderia ser uma intervenção capaz de modular essa sinalização, uma vez que estudos prévios demonstraram que o exercício físico era capaz de modular a Notch1 em outros tecidos (CATOIRE et al., 2012; MACKENZIE et al., 2013; ZHANG et al., 2018). Nesse sentido, pela primeira vez na literatura, identificou-se que o exercício físico foi eficaz em reduzir o conteúdo proteico de Notch1 e NICD total assim como NICD nuclear no tecido hepático. Conseqüentemente, pode-se inferir que essas modificações podem estar contribuindo na melhora da homeostase glicêmica de animais obesos bem como na regulação dos níveis proteicos de enzimas gliconeogênicas. Além disso, sugerimos que estudos que buscam entender os efeitos de outros protocolos de exercício, como aeróbios, força ou concorrentes, busquem analisar a via da Nocth1 no tecido hepático, com o intuito de ampliar

o conhecimento sobre os efeitos do exercício frente a esta via e promover a prática mais eficiente e segura para prejuízos metabólicos associados a obesidade.

Com intuito de entender quais os mecanismos que podem estar proporcionando as reduções na atividade da Notch1, destaca-se que os camundongos exercitados reduziram o conteúdo proteico de Presinilina-1. Ademais, o exercício diminuiu os níveis de RNAm de *Presinilina1* assim como a expressão de *Nicastrin*. Outros estudos utilizaram da inibição do complexo γ -secretase para controlar a Notch1, assim como o nosso trabalho (COOK et al., 2012; PLENTZ et al., 2009). A injeção aguda e crônica (5 dias) de inibidor de gama-secretase foi capaz de melhorar a sensibilidade a insulina e reduzir a glicemia basal de camundongos obesos induzidos por dieta e ob/ob (PAJVANI et al., 2011). Mais recente, apropriando-se da utilização de técnicas modernas no desenvolvimento de fármacos, Richter e colaboradores (2020), inseriram o inibidor de γ -secretase em nanopartículas a fim de ampliarem a distribuição da droga no organismo e evitar efeitos adversos provocados por essa substância (RICHTER et al., 2020). Dessa modo, foi observado redução da produção de glicose, sem nenhuma alteração intestinais, confirmando a efetividade dos inibidores γ -secretase (RICHTER et al., 2020). No presente estudo, foi utilizado o inibidor DAPT, uma vez que seu mecanismo de inibição se dá por meio da Presinilina-1 (WOLFE, 2019). Aqui, verificou-se que esse inibidor foi efetivo na supressão da produção hepática de glicose assim como no conteúdo proteico de G6Pase e PEPCK. Portanto, pode-se sugerir que a redução de proteínas chaves do complexo γ -secretase, especificamente a Presinilina-1, como um dos possíveis mecanismos de controle da Notch1 mediado pelo exercício físico.

Outro ponto significativo é que a inibição de γ -secretase e especificamente da Nicastrin, reduz a intolerância a glicose e melhora os níveis plasmáticos de TAG (KIM et al., 2018). Aqui, foi possível identificar que os animais treinados, *swiss* e ob/ob, também apresentaram melhora nos níveis plasmáticos de TAG e das outras lipoproteínas, independente da redução da massa corporal dos animais. No entanto, assim como estudo prévio do nosso grupo, apesar de não alterar a massa corporal, o treinamento físico aeróbio foi eficiente em reduzir a adiposidade nesses animais (GASPAR et al., 2019b). Assim, exercício físico aeróbio mostra-se uma importante estratégia no controle do perfil lipídico de pacientes com doenças coronarianas,

indivíduos que apresentam um perfil lipídico desregulado (MUSCELLA; STEFÀNO; MARSIGLIANTE, 2020). Recentemente, foi verificado que o tratamento de quatro semanas com DAPT, em camundongos obesos, reduziu o perfil lipídico sérico dos animais bem como reduzir o acúmulo de lipídeos no fígado (ZHANG et al., 2021). Assim podemos sugerir que a modulação da Notch1 pelo exercício físico também pode contribuir para melhora no perfil lipídico dos camundongos obesos exercitados.

Além da melhora do perfil lipídico sérico, verificou-se que os animais exercitados apresentaram melhora nos níveis lipídicos no tecido hepático. O exercício físico, seja ele aeróbio ou resistido, tem sido apontado como uma importante intervenção para o tratamento DHGNA. Observa-se que em modelos experimentais de obesidade, diabetes e em humanos, o treinamento aeróbio é eficiente em reduzir o acúmulo de lipídeos hepáticos (KAPRAVELOU et al., 2015; KEATING et al., 2015; MUÑOZ et al., 2018). Nesse contexto, a Notch1 parece ser uma via importante no metabolismo lipídico hepático. Inicialmente, verificou-se que a Notch1 junto ao fator de transcrição RBPJ é uma via importante para controle da lipogênese hepática, uma vez que essa sinalização favorece uma maior estabilização do complexo mTORC1. Quando inibidas, os animais tornaram-se mais resistentes em acumular lipídeos no fígado (PAJVANI et al., 2013). O complexo mTORC1 desempenha um papel importante no metabolismo lipídico hepático, pois é responsável pela regulação da atividade de SREBP-1C, que por sua vez, controla a síntese de lipídeos no tecido hepático (HAN; WANG, 2018; MOON, 2017). Portanto, no presente estudo, identificou-se que os animais treinados, *swiss* e *ob/ob*, apresentaram redução de NICD e de SREBP-1C. Sobretudo nos animais *swiss* que realizaram o treinamento físico aeróbio, encontrou-se que os níveis de NICD estavam reduzidos no núcleo assim como esses animais ficaram protegidos de aumentar os níveis de RBPJ nuclear. Recentemente, em humanos, identificou-se que a Notch1 está relacionado com a severidade da esteatose hepática (ZHU et al., 2018). Apesar disso, outro grupo de pesquisadores encontraram que a deleção da Notch1 induziu a esteatose hepática em modelos experimentais e pacientes com DHGNA e esteatose hepática apresentaram uma redução na expressão gênica de Notch1 (BERNSMEIER et al., 2016). Levando em consideração esses aspectos, nosso trabalho vai ao encontro dos

achados de Pajvani e seu grupo de pesquisa (PAJVANI et al., 2013; VALENTI et al., 2013; ZHU et al., 2018).

Outro mecanismo descrito, não avaliado nesse trabalho, que pode explicar a ativação da Notch1 na obesidade e o efeito do exercício nessa via, é a inflamação. Recentemente, foi verificado que humanos com esteatose hepática bem como modelos experimentais de esteatose hepática, apresentam aumentam da proteína Jag1, ligante da Notch1 (YU et al., 2021). A inibição especificamente de Jag1 no fígado, protegeu do acúmulo de lipídios no fígado em camundongos. Interessantemente, quando inibido o receptor do tipo toll 4 (TLR4), também no fígado, reduziu o conteúdo proteico de Jag1 e conseqüentemente a fibrose hepática, sugerindo uma relação na via TLR4 - o fator nuclear kappa B (NF-kB) e Jag1-Notch1 (YU et al., 2021). Estudo préveio do nosso laboratório, demonstrou que o treinamento físico aeróbio em esteira em camundongos obesos, reduziu a concentração de proteínas inflamatórias no fígado, principalmente a fosforilação de Ikappa quinase B-alfa ($I\kappa B-\alpha$), sugerindo redução na ativação de NF-kB (GASPAR et al., 2019b). Além disso, esses animais apresentaram uma redução na esteatose hepática (GASPAR et al., 2019b). Mais recente, foi verificado que o exercício físico intervalado de alta intensidade de corrida em esteira foi mais eficaz em reduzir a esteatose e a inflamação hepática do que o exercício físico moderado em camundongos (FREDRICKSON et al., 2021). Desse modo, apesar de não ter avaliado marcadores inflamatórios, podemos sugerir que um dos mecanismos associados a redução da ativação de Notch1 nos camundongos exercitados, pode estar atrelado a redução da inflamação.

Ainda no contexto da lipogênese, tem sido investigado compostos capazes de aumentar a atividade mitoncondrial e conseqüentemente aumentar a oxidação de gordura, como estratégias no combate a esteatose hepática (GOEDEKE; SHULMAN, 2021). Song e colaboradores (2016), demonstraram que a inibição da Notch1 em camundongos bem como em células hepáticas HepG2, aumentou a expressão de genes associados a oxidação de lipídeos (SONG et al., 2016). Os autores sugerem que esse controle pode se dar por meio da Hes1 ou de NICD, no entanto, esse mecanismo ainda não é totalmente compreendido (SONG et al., 2016). Aqui, nós encontramos que animais obesos apresentam um prejuízo na capacidade respiratória mitocondrial e exercício físico foi capaz de restabelecer a respiração mitocondrial, apesar de

não ter apresentado diferença nas proteínas dos complexos OXPHOS. Ao encontro de nossos achados, o exercício físico aeróbio, seja um corrida em esteira ou em feito de forma espontânea, demonstrou-se ser efetivo no aumento da respiração mitocondrial (FLETCHER et al., 2014). Por outro lado, embora o exercício físico, de modo geral, tenha a capacidade de aumentar as proteínas do complexo OXPHOS no fígado, essa discussão ainda continua em aberto, uma vez que essa resposta possa variar em decorrência do tipo de exercício, volume, intensidade e do modelo experimental utilizado (STEVANOVIĆ et al., 2020). Além disso, outro macador que pode sugerir o aumento da oxidação de lipídeos no nosso modelo experimental, é o aumento CPT1A nos animais OBT, uma vez que CPT1 é capaz de direcionar acil-CoA para oxidação lipídica na mitocôndria (SCHLAEPFER; JOSHI, 2020).

Tomados em conjuntos os nossos achados, algumas perguntas continuam em aberto para futuros projetos de pesquisa: Qual o mecanismo pelo qual o exercício físico aeróbio controla a ativação da Notch1? Complexo γ -secretase, inflamação-Jag1 ou ambos? Visto que o treinamento de alta intensidade mostrou um efeito maior em resposta a esteatose hepática, qual seria o efeito de método de treino na via da Notch1? Seria o exercício resistido capaz de controlar a ativação de Notch1? Qual a relação entre o mecanismo da Notch1 e a oxidação lipídica? As limitações do nosso estudo foi a impossibilidade da realização de experimentos com animais *knockout* de Notch1 no tecido hepático, o que possibilitaria confirmar os nossos achados nesse importante modelo experimental. Além disso, nossos resultados ainda não podem ser transpostos para humanos, porém são fortes as evidências da presença desse mecanismo em humanos, mas não efetivamente com o exercício físico (VALENTI et al., 2013; YU et al., 2021; ZHU et al., 2018). Embora a via da Notch1 seja um caminho longo a ser percorrido, nosso trabalho mostrou que o treinamento aeróbio é uma peça-chave na modulação da Notch1 no fígado de camundongos obesos.

CONCLUSÃO

A presente proposta de pesquisa científica traz importantes avanços na compreensão dos mecanismos intracelulares envolvendo a via de sinalização da Notch1 e os processos de gliconeogênese e lipogênese no tecido hepático na condição de obesidade. Além disso, pela primeira vez foi demonstrado que o exercício aeróbio foi capaz de atenuar os efeitos negativos da dieta rica em gordura sobre o metabolismo hepático por meio dessa sinalização. Em conjunto, os achados desse estudo demonstram que treinamento físico aeróbio suprimiu a sinalização da Notch1 e este efeito revela ser relacionado a supressão de proteínas do complexo γ -secretase, que é um ponto chave no controle da atividade da Notch1 no tecido hepático. Portanto, conclui-se que a regulação da sinalização da Notch1 hepática através do treinamento físico aeróbio foi relevante para diminuir tanto a gliconeogênese quanto a lipogênese no fígado de camundongos obesos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEX, S. et al. Exercise training improves liver steatosis in mice. p. 1–11, 2015.
- ARAÚJO, E. P. et al. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**, 2007.
- BERNSMEIER, C. et al. Hepatic Notch1 deletion predisposes to diabetes and steatosis via glucose-6-phosphatase and perilipin-5 upregulation. **Laboratory Investigation**, 2016.
- BI, P.; KUANG, S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 248–255, 2015.
- BUETTNER, C. et al. Severe impairment in liver insulin signaling fails to alter hepatic insulin action in conscious mice. **Journal of Clinical Investigation**, 2005.
- CATOIRE, M. et al. Pronounced Effects of Acute Endurance Exercise on Gene Expression in Resting and Exercising Human Skeletal Muscle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.
- CHENG, Z. FoxO1: mute for a tuned metabolism? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 8, p. 402–403, 2015.
- CINTRA, D. E. et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
- COOK, N. et al. **Gamma secretase inhibition promotes hypoxic necrosis in mouse pancreatic ductal adenocarcinoma** **Journal of Experimental Medicine**, 2012.
- CZECH, M. P. Obesity Notches up fatty liver. **Nature medicine**, v. 19, n. 8, p. 969–71, 2013.
- DA LUZ, G. et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 9, p. 2015–2023, 2011.
- DA ROCHA, A. L. et al. Exhaustive Training Leads to Hepatic Fat Accumulation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 8, p. 2094–2103, 2017.
- DE SOUZA, C. T. et al. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4 α pathway in insulin resistant mice. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 12, p. 2239–2253, 2010.
- DONG, X. C. et al. Inactivation of Hepatic Foxo1 by Insulin Signaling Is Required for

- Adaptive Nutrient Homeostasis and Endocrine Growth Regulation. **Cell Metabolism**, 2008.
- FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007.
- FLETCHER, J. A. et al. Impact of Various Exercise Modalities on Hepatic Mitochondrial Function. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 46, n. 6, p. 1089–1097, jun. 2014.
- FREDERICO, M. J. et al. Short-term inhibition of SREBP-1c expression reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 46, n. 11, p. 1381–1388, 2011.
- FREDRICKSON, G. et al. Exercise of high intensity ameliorates hepatic inflammation and the progression of NASH. **Molecular Metabolism**, v. 53, n. June, p. 101270, 2021.
- GASPAR, R. et al. Unsaturated fatty acids from flaxseed oil and exercise modulate GPR120 but not GPR40 in the liver of obese mice: a new anti-inflammatory approach. **J Nutr Biochem**, v. 66, p. 52–62, 2019a.
- GASPAR, R. C. et al. Acute physical exercise increases the adaptor protein APPL1 in the hypothalamus of obese mice. **Cytokine**, v. 110, 2018.
- GASPAR, R. C. et al. Unsaturated fatty acids from flaxseed oil and exercise modulate GPR120 but not GPR40 in the liver of obese mice: a new anti-inflammatory approach. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 66, 2019b.
- GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M. A. **Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 2006.
- GLUCKMAN, P. D. et al. Losing the war against obesity: the need for a developmental perspective. **Science translational medicine**, v. 3, p. 93cm19, 2011.
- GOEDEKE, L.; PERRY, R. J.; SHULMAN, G. I. **Emerging pharmacological targets for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease, insulin resistance, and type 2 diabetes** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2019.
- GOEDEKE, L.; SHULMAN, G. I. Therapeutic potential of mitochondrial uncouplers for the treatment of metabolic associated fatty liver disease and NASH. **Molecular Metabolism**, v. 46, p. 101178, abr. 2021.

- GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 415–445, 2011.
- GU, L. et al. Spexin alleviates insulin resistance and inhibits hepatic gluconeogenesis via the foxo1/pgc-1 α pathway in high-fat-diet-induced rats and insulin resistant cells. **International Journal of Biological Sciences**, 2019.
- GUO, R. et al. Beneficial mechanisms of aerobic exercise on hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. v. 14, n. 2, p. 139–144, 2015.
- HAN, J.; WANG, Y. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism. **Protein and Cell**, v. 9, n. 2, p. 145–151, 2018.
- HANNAH, W. N.; HARRISON, S. A. **Effect of Weight Loss, Diet, Exercise, and Bariatric Surgery on Nonalcoholic Fatty Liver Disease** *Clinics in Liver Disease*, 2016.
- HAWLEY, J. A et al. Integrative Biology of Exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738–749, 2014.
- HORI, K.; SEN, A.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 10, p. 2135–2140, 2013.
- JIANG, L. et al. Blockade of Notch signaling promotes acetaminophen-induced liver injury. **Immunologic Research**, v. 65, n. 3, p. 739–749, 2017.
- KAPRAVELOU, G. et al. Aerobic interval exercise improves parameters of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and other alterations of metabolic syndrome in obese Zucker rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 40, n. 12, p. 1242–1252, dez. 2015.
- KEATING, S. E. et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 1, p. 174–182, 2015.
- KIM-MULLER, J. Y. et al. Metabolic Inflexibility Impairs Insulin Secretion and Results In MODY-like Diabetes in Triple FoxO-Deficient Mice. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 593–602, 2014.
- KIM, K. J. et al. γ -Secretase Inhibition Lowers Plasma Triglyceride-Rich Lipoproteins by Stabilizing the LDL Receptor. **Cell Metabolism**, 2018.
- KITADE, H. et al. **Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: New insights and potential new treatments** *Nutrients*, 2017.
- KNUDSEN, J. G. et al. Skeletal muscle IL-6 and regulation of liver metabolism during high-

fat diet and exercise training. **Physiological Reports**, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LI, X. et al. Treatment with PPAR δ agonist alleviates non-alcoholic fatty liver disease by modulating glucose and fatty acid metabolic enzymes in a rat model. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 36, n. 3, p. 767–775, 2015.

LOOMBA, R.; FRIEDMAN, S. L.; SHULMAN, G. I. **Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease** *Cell*, 2021.

MACKENZIE, M. G. et al. Inhibition of Myostatin Signaling through Notch Activation following Acute Resistance Exercise. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–7, 2013.

MARINHO, R. et al. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. September, p. 2917–2926, 2012.

MATSUMOTO, M. et al. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 9, p. 2464–72, 2006.

MATSUMOTO, M. et al. Impaired Regulation of Hepatic Glucose Production in Mice Lacking the Forkhead Transcription Factor Foxo1 in Liver. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 3, p. 208–216, 2007.

MEEH, R. C. R.; WATT, M. J. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. **Nature reviews. Endocrinology**, 2017.

MOON, Y. The SCAP / SREBP Pathway : A Mediator of Hepatic Steatosis. p. 6–10, 2017.

MUÑOZ, V. R. et al. Physical exercise reduces pyruvate carboxylase (PCB) and contributes to hyperglycemia reduction in obese mice. **The Journal of Physiological Sciences**, jul. 2017.

MUÑOZ, V. R. et al. Exercise decreases CLK2 in the liver of obese mice and prevents hepatic fat accumulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 7, 2018.

MUÑOZ, V. R. et al. Physical exercise increases ROCK activity in the skeletal muscle of middle-aged rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 186, 2020.

MUSCELLA, A.; STEFÀNO, E.; MARSIGLIANTE, S. The effects of exercise training on lipid

- metabolism and coronary heart disease. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 319, n. 1, p. H76–H88, 2020.
- NAKAMURA, M. T.; YUDELL, B. E.; LOOR, J. J. **Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids***Progress in Lipid Research*, 2014.
- O-SULLIVAN, I. et al. FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. **Nature Communications**, v. 6, n. May, p. 7079, 2015.
- OGURTSOVA, K. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2017.
- PAJVANI, U. B. et al. Inhibition of Notch signaling ameliorates insulin resistance in a FoxO1-dependent manner. **Nature medicine**, v. 17, n. 8, p. 961–967, 2011.
- PAJVANI, U. B. et al. Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTorc1 stability. **Nature medicine**, v. 19, n. 8, p. 1054–60, 2013.
- PAJVANI, U. B.; ACCILI, D. **The new biology of diabetes***Diabetologia*, 2015.
- PEREIRA, R. M. et al. Short-term strength training reduces gluconeogenesis and NAFLD in obese mice. **Journal of Endocrinology**, 2019.
- PEREIRA, R. M. et al. Strength exercise reduces hepatic pyruvate carboxylase and gluconeogenesis in DIO mice. **Journal of Endocrinology**, 2020.
- PETERSEN, K. F. et al. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, 2005.
- PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. **Mechanisms of insulin action and insulin resistance***Physiological Reviews*, 2018.
- PETERSEN, M. C.; VATNER, D. F.; SHULMAN, G. I. Regulation of Hepatic Glucose Metabolism in Health and Disease. **Nature Publishing Group**, 2017.
- PLENTZ, R. et al. Inhibition of γ -Secretase Activity Inhibits Tumor Progression in a Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Gastroenterology**, 2009.
- QU, S. et al. Aberrant forkhead box O1 function is associated with impaired hepatic metabolism. **Endocrinology**, 2006.

- QUINN, W. J.; BIRNBAUM, M. J. Distinct mTORC1 pathways for transcription and cleavage of SREBP-1c. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 40, p. 15974–15975, 2012.
- RICHTER, L. R. et al. Targeted Delivery of Notch Inhibitor Attenuates Obesity-Induced Glucose Intolerance and Liver Fibrosis. **ACS Nano**, 2020.
- RODEN, M.; SHULMAN, G. I. **The integrative biology of type 2 diabetes** *Nature*, 2019.
- SAMUEL, V. T. et al. Targeting Foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. **Diabetes**, 2006.
- SAVAGE, D. B.; SEMPLE, R. K. Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and their links to insulin resistance. **Curr Opin in Lipidol**, v. 21, n. 4, p. 329–336, 2010.
- SCHLAEPFER, I. R.; JOSHI, M. CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. **Endocrinology (United States)**, v. 161, n. 2, p. 1–14, 2020.
- SONG, N.-J. et al. Notch1 deficiency decreases hepatic lipid accumulation by induction of fatty acid oxidation. **Scientific reports**, v. 6, n. November 2014, p. 19377, 2016.
- STEVANOVIĆ, J. et al. **Physical exercise and liver “fitness”: Role of mitochondrial function and epigenetics-related mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease** *Molecular Metabolism*, 2020.
- THYFAULT, J. P.; SCOTT RECTOR, R. Exercise combats hepatic steatosis: Potential mechanisms and clinical implications. **Diabetes**, 2020.
- TITCHENELL, P. M.; LAZAR, M. A.; BIRNBAUM, M. J. Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 7, p. 497–505, 2017.
- TSUZUKI, T. et al. Voluntary Exercise Can Ameliorate Insulin Resistance by Reducing iNOS-Mediated S-Nitrosylation of Akt in the Liver in Obese Rats. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0132029, 2015.
- UMPIERRE, D. et al. Physical Activity Advice Only or Structured exercise training and association With HbA 1c Levels in Type 2 Diabetes. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 305, p. 1790–1799, 2011.
- VALENTI, L. et al. Hepatic notch signaling correlates with insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4052–4062, 2013.

VON SCHULZE, A. et al. Hepatic mitochondrial adaptations to physical activity: Impact of sexual dimorphism, PGC1 α and BNIP3-mediated mitophagy. **Journal of Physiology**, 2018.

WOLFE, M. S. Structure and Function of the γ -Secretase Complex. **Biochemistry**, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health Topics**. Disponível em:

<https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1>.

YU, J. et al. Hepatocyte TLR4 triggers inter-hepatocyte Jagged1/Notch signaling to determine NASH-induced fibrosis. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 599, p. eabe1692, 2021.

ZHANG, M. et al. **Inhibition of Notch1 signaling reduces hepatocyte injury in nonalcoholic fatty liver disease via autophagy** **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2021.

ZHANG, X. et al. Voluntary running-enhanced synaptic plasticity, learning and memory are mediated by Notch1 signal pathway in C57BL mice. **Brain Structure and Function**, 2018.

ZHU, C. et al. Hepatocyte Notch activation induces liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 468, p. 1–14, 2018.

ANEXO

Aprovação do comitê de ética 1



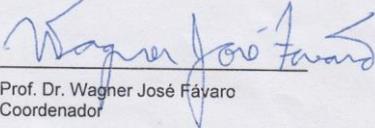

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Papel do exercício físico na regulação da proteína Notch1 em camundongos obesos: efeitos sobre a lipogênese e gliconeogênese hepática, registrada com o nº 4853-1/2018, sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Rodrigo Pauli e Rafael Calais Gaspar, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 31 de maio de 2018.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	20/04/2018-20/04/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	31/05/2018-20/04/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	120
Idade/Peso:	04 semanas / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	16
Idade/Peso:	04 semanas / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lepob/JUnib
No. de animais:	32
Idade/Peso:	04 semanas / 25g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Ciências do Esporte, FCA/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 31 de maio de 2018.



Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Coordenador



Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Aprovação do comitê de ética 2



CERTIFICADO

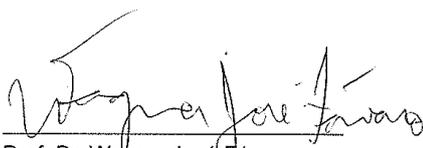
Certificamos que a proposta intitulada **Papel do exercício físico na regulação da proteína Notch1 em camundongos obesos**, registrada com o nº **5583-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. José Rodrigo Pauli e Rafael Calais Gaspar**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/08/2020**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/10/2020 a 01/10/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/08/2020 a 01/10/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / B6.V-Lepob/JUnib
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Origem:	CEMIB UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Ciências do Esporte, FCA/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 29 de setembro de 2020.


 Prof. Dr. Wagner José Fávares
 Presidente


 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Aprovação da comissão interna de biossegurança

APROVAÇÃO APEX nº 10/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS
CIDADE UNIVERSITÁRIA DE LIMEIRA

**INTERESSADO:** FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**ASSUNTO:** PROJETO DE PESQUISA DE DOUTORADO DO ALUNO RAFAEL CALAIS GASPAR**APROVAÇÃO AD REFERENDUM DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA****CIBio/FCA Nº 07/2021**

Aprovo *ad referendum* da Comissão Interna de Biossegurança – CIBio/FCA da Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp, o desenvolvimento do projeto de pesquisa de doutorado do aluno Rafael Calais Gaspar, intitulado: “Papel do exercício físico na regulação da proteína Notch1 em camundongos obesos: efeitos sobre a lipogênese e gliconeogênese hepática.”, (nº 2021/07) sob responsabilidade do Prof. Dr. José Rodrigo Pauli, com vigência de 07/2021 a 07/2023, por estar de acordo com a legislação vigente que regulamenta as atividades que envolvem organismos geneticamente modificados – OGMs e seus derivados.

O referido *ad referendum* será submetido a homologação na próxima reunião da Comissão Interna de Biossegurança – CIBio/FCA da Faculdade de Ciências Aplicadas, prevista para o ano de 2021.

Cidade Universitária de Limeira

21 de maio de 2021

Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi
Presidente da CIBio/FCA (CQB: 370)
Matrícula 296850

Diretoria de Pesquisa e Extensão | Secretaria de Pesquisa
R. Pedro Zaccaria, 1300 – Jd. Santa Luiza – Limeira/SP - CEP 13.484-350
Telefones: (19) 3701-6663 | FAX: (19) 3701-6680
apex@fca.unicamp.br | www.fca.unicamp.br

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 3EF7A038 B7244DA5 BDBAC588 3DDD6D08

APÊNDICE

LISTA DE PUBLICAÇÃO

Papers de primeiro autor:

- 1- **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.
- 2- **GASPAR, RC**; MUNOZ, VR; MACEDO, APA; VIERIA, RFL; PAULI, JR. A Palette of Adipose Tissue: Multiple Functionality and Extraordinary Plasticity. TRENDS IN ANATOMY AND PHYSIOLOGY, 2021.
- 3- **GASPAR, RC**; NAKANDAKARI, SCBR; MUÑOZ, VR; VIEIRA, RFL SILVA, DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Acute physical exercise increases PI3K-p110 α protein content in the hypothalamus of obese mice. JOURNAL OF ANATOMY, 2020.
- 4- **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; NAKANDAKARI, SCBR; VIEIRA, RFL; DA CONCEIÇÃO, LR; DE OLIVEIRA, F; CRISOL, BM; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; ZAGHLOUL, I; MEKARY, RA; PAULI, JR. Aging is associated with increased TRB3, ER stress, and hepatic glucose production in the liver of rats. EXPERIMENTAL GERONTOLOGY, 2020.
- 5- **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; KUGA, GK; NAKANDAKARI, SCBR; CRISOL, BM; LENHARE, L; BREDAS, L; BOTEZELLI, JD; SANT'ANA, MR; SILVA, AS; CINTRA, DE; MOURA, LP; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Acute physical exercise increases APPL 1/ PI 3K signaling in the hypothalamus of lean mice. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 2019.
- 6- **GASPAR, RC***; VEIGA, CB*; BESSI, MP; DATILO, MN; SANT'ANA, MR; RODRIGUES PB; DE MOURA, LP; DA SILVA, ASR; SANTOS, GA; CATHARINO RR; ROPELLE, ER; PAULI, JR; CINTRA, DE. Unsaturated Fatty Acids from Flaxseed Oil and Exercise

- Modulate GPR120 but not GPR40 in the Liver of Obese Mice: A New Anti-inflammatory Approach. *THE JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY*, 2019.
- 7- **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; KUGA, GK; NAKANDAKARI, SCBR; MINUZZI, LG; BOTEZELLI, JD; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Acute physical exercise increases leptin-induced hypothalamic extracellular signal-regulated kinase1/2 phosphorylation and thermogenesis of obese mice. *JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY*, 2019.
- 8- **GASPAR, RC**, GABRIEL KEINE; MUÑOZ, VR; COOPE, A; CAMBRI, LT; GHEZZI, AC; MOURA, LP; LEME, JACA; PAULI, JR; BOTEZELLI, JD. Physical training prevent and treat hepatic lipid accumulation induced by fructose-rich diet. *BIOSCIENCE JOURNAL*, 2018.
- 9- **GASPAR, RC**; BOTEZELLI, JD; KUGA, GK; MUNOZ, VR; COOPE, A; PEREIRA, RM; SILVA, ASR; CINTRA, DE; MOURA, LP; ROPELLE, ER; PAULI, JR. High dose Vitamin D regulates the energy metabolism and increases insulin sensitivity, but are associated with high levels of kidney damage. *DRUG DEVELOPMENT RESEARCH*, 2017.

Papers de colaboração:

- 1- MUÑOZ, VR.; **GASPAR, RC**; SEVERINO, MB; MACÊDO, APA; SIMABUCO, FM; ROPELLE, ER; CINTRA, DE; DA SILVA, ASR; KIM, YB; PAULI, JR. Exercise Counterbalances Rho/ROCK2 Signaling Impairment in the Skeletal Muscle and Ameliorates Insulin Sensitivity in Obese Mice. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 1, 2021.
- 2- VIEIRA, RFL; MUÑOZ, VR; JUNQUEIRA, RL; OLIVEIRA, F; **GASPAR, RC**; NAKANDAKARI, SCBR; COSTA, SO; TORSONI, MA; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; MOURA, LP; ROPELLE, ER; ZAGHLOUL, I; MEKARY, RA; PAULI, JR. 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.

- 3- MINUZZI, LG; DA CONCEIÇÃO, LR; MUÑOZ, VR; VIEIRA, RFL; **GASPAR, RC**; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; MOURA, LP; ROPELLE, ER; TEIXEIRA, AM; PAULI, JR. Effects of short-term physical training on the interleukin-15 signaling pathway and glucose tolerance in aged rats, *CYTOKINE*, 2021.
- 4- LYU, K; ZHANG, Y; ZHANG, D; KAHN, M; TER HORST, KW; RODRIGUES, MRS; **GASPAR, RC**; HIRABARA, SM; LUUKKONEN, PK; LEE, S; BHANOT, S; RINEHART, J; BLUME, N; RASCH, MG; SERLIE, MJ; BOGAN, JS; CLINE, GW; SAMUEL, VT; SHULMAN, GI. A Membrane-Bound Diacylglycerol Species Induces PKC ϵ -Mediated Hepatic Insulin Resistance. *CELL METABOLISM*, 2020.
- 5- VIERIA, RFL; JUNQUEIRA, RL; **GASPAR, RC**; MUNOZ, VR; PAULI, JR. Exercise activates AMPK signaling: Impact on glucose uptake in the skeletal muscle in aging. *JOURNAL OF REHABILITATION THERAPY*, 2020.
- 6- MUÑOZ, VR; VIEIRA, RFL; **GASPAR, RC**. When fasting results in metabolic damage: a matter of gender. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON*, 2020.
- 7- MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; ESTECA, MV; BAPTISTA, IL; VIEIRA, RFL; RAMOS DA SILVA, AS; DE MOURA, LP; CINTRA, DE; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Physical exercise increases ROCK activity in the skeletal muscle of middle-aged rats. *MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT*, 2020.
- 8- PEREIRA, RM; MUNOZ, VR; ANARUMA, CP; **GASPAR, RC**; GASPAR, RS; ROPELLE, ER; CINTRA, DE; SILVA, ASR; PAULI, JR; MOURA, LP. 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.
- 9- CEZARONI, MG; BREDA, L; KUGA, GK; **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; CAMPOS, TDP; CANCEGLIERI, RS; PAULI, JR; CANCEGLIERI, PH. Analysis of body weight of adults by different indirect methods. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano*, 2020.
- 10- DE VICENTE, LG; PINTO, AP; MUÑOZ, VR; ROVINA, RL; DA ROCHA, AL; **GASPAR, RC**; DA SILVA, LECM; SIMABUCO, FM; FRANTZ, FG; PAULI, JR; DE MOURA, LP; CINTRA, DE; ROPELLE, ER; DA SILVA, ASR. Tlr4 participates in the

- responses of markers of apoptosis, inflammation, and ER stress to different acute exercise intensities in mice hearts. *LIFE SCIENCES*, 2020.
- 11- MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; MINUZZI, LG; CANCEGLIERI, RS; DA SILVA, ADELINO AS; DE MOURA, LP; CINTRA, DE; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Rho-kinase activity is upregulated in the skeletal muscle of aged exercised rats. *EXPERIMENTAL GERONTOLOGY*, 2019.
- 12- NAKANDAKARI, SCBR; MUÑOZ, VR; KUGA, GK; **GASPAR, RC**; SANT'ANA, MR; MORELLI, AP; PAVAN, ICB; DA SILVA, LGS; SIMABUCO, FM; DA SILVA, ASR; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; CINTRA, DE; PAULI, JR. Short-term High-Fat Diet Consumption Increases the Alzheimer's Disease Pathogenic Proteins in the Hippocampus. *BRAIN, BEHAVIOR, AND IMMUNITY*, 2019.
- 13- MINUZZI, LG; KUGA, GK; BRENDA, L; **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; PEREIRA, RM; BOTEZELLI, JD; DA SILVA, AS; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; PAULI, JP. Short-term Resistance Training Increases APPL1 Content in the Liver and the Insulin Sensitivity of Mice Fed a Long-term High-fat Diet. *EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES*, 2019.
- 14- PINTO, AP; DA ROCHA, AL; KOHAMA, EB; **GASPAR, RC**; SIMABUCO, FM; FRANTZ, FG; DE MOURA, LP; PAULI, JR; CINTRA, DE; ROPELLE, ER; DE FREITAS, EC; DA SILVA, ASR. Exhaustive acute exercise-induced ER stress is attenuated in IL-6-knockout mice. *JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY*, 2019.
- 15- MINUZZI, LG; CHUPEL, MB; RAMA, L; ROSADO, F; MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; KUGA, GK; FURTADO, GE; PAULI, JR; TEIXEIRA, AM. Lifelong exercise practice and immunosenescence: Master athletes cytokine response to acute exercise, *CYTOKINE*, 2019.
- 16- CRISOL, BM; VEIGA, CB; BRAGA, RR; LENHARE, L; BAPTISTA, IL; **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; CORDEIRO, AV; DA SILVA, AS; CINTRA, DE; MOURA, LP; PAULI, JR; ROPELLE, ER. NAD⁺ precursor increases aerobic performance in mice. *EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION*, 2019.

- 17- MINUZZI, LG; RAMA, L; CHUPEL, MU; ROSADO, F; KUGA, GK; **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; PAULI, JR; PAIVA, A; TEIXEIRA, AM. Immune-endocrine responses and physical performance of master athletes during the sports season. *JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY*, 2019.
- 18- MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; KUGA, GK; PAVAN, ICB; SIMABUCO, FM; DA SILVA, ASR; DE MOURA, LP; CINTRA, DE; ROPELLE, ER; PAULI, JR. The effects of aging on rho kinase and insulin signalling in skeletal muscle and white adipose tissue of rats. *JOURNALS OF GERONTOLOGY SERIES A-BIOLOGICAL SCIENCES AND MEDICAL SCIENCES*, 2018.
- 19- CRISOL, BM; LENHARE, L; GASPAR, RS; **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; PAULI, JR; ROPELLE, ER. The role of physical exercise on Sestrin1 and 2 accumulations in the skeletal muscle of mice. *LIFE SCIENCES*, 2018.
- 20- KUGA, GK; MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; NAKANDAKARI, SCBR; DA SILVA, ASR; BOTEZELLI, JD; DE ALMEIDA LEME, JAC; GOMES, RJ; DE MOURA, LP; CINTRA, DE; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Impaired insulin signaling and spatial learning in middle-aged rats: The role of PTP1B. *EXPERIMENTAL GERONTOLOGY*, 2018.
- 21- MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; KUGA, GK; NAKANDAKARI, SCBR; BAPTISTA, IL; MEKARY, RA; DA SILVA, ASR; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; CINTRA, DE; PAULI, JR. Exercise decreases CLK2 in the liver of obese mice and prevents hepatic fat accumulation. *JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY*, 2018.
- 22- **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; FORMIGARI, GP; KUGA, GK; NAKANDAKARI, SCRB; BOTEZELLI, JD; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Acute physical exercise increases the adaptor protein APPL1 in the hypothalamus of obese mice. *CYTOKINE*, 2018.
- 23- KUGA, GK; **GASPAR, RC**; MUÑOZ, VR; NAKANDAKARI, SCBR; BREDA, L; SANDOVAL, BM; CAETANO, FH; LEME, JACA; PAULI, JR; GOMES, RJ. Physical training reverses changes in hepatic mitochondrial diameter of Alloxan-induced diabetic rats. *EINSTEIN (SAO PAULO)*, 2018.

- 24- CANCEGLIERI, PH; KUGA, GK; MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; DA ROCHA, AL; BREDA, L; ANARUMA, CP; MINUZZI, LG; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; PAULI, JR. The reversal effect of physical exercise on aging-related increases in APPL2 content in skeletal muscle. LIFE SCIENCES, 2018.
- 25- MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; KUGA, GK; DA ROCHA, AL; CRISOL, BM; BOTEZELLI, JD; BAPTISTA, IL; MEKARY, RA; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Exercise increases Rho-kinase activity and insulin signaling in skeletal muscle. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, 2018.
- 26- MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; CRISOL, BM; FORMIGARI, GP; SANTANA, MR; BOTEZELLI, JD; GASPAR, RS; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Physical exercise reduces pyruvate carboxylase (PCB) and contributes to hyperglycemia reduction in obese mice. JOURNAL OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, 2017.
- 27- KUGA, GK; BOTEZELLI, JD; **GASPAR, RC**; GOMES, RJ; PAULI, JR; CURIACOS, JA. Hippocampal insulin signaling and neuroprotection mediated by physical exercise in Alzheimer's Disease. MOTRIZ, 2017.
- 28- RODRIGUES, BA; KUGA, GK; MUÑOZ, VR; **GASPAR, RC**; TAVARES, MR; BOTEZELLI, JD; DA SILVA, ASR; CINTRA, DE; DE MOURA, LP; SIMABUCO, FM; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Overexpression of Mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 (MKP-3) reduces FoxO1 phosphorylation in mice hypothalamus. NEUROSCIENCE LETTERS, 2017.
- 29- RODRIGUES, BA; MUÑOZ, VR; KUGA, GK; **GASPAR, RC**; NAKANDAKARI, SCBR; CRISOL, BM; BOTEZELLI, JD; PAULI, LSS; DA SILVA, ASR; DE MOURA, LP; CINTRA, DE; ROPELLE, ER; PAULI, JR. Obesity Increases Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-3 Levels in the Hypothalamus of Mice. FRONTIERS IN CELLULAR NEUROSCIENCE, 2017.