
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

(Biodinâmica da Motricidade Humana)

CAROLINA CABRAL SANTOS

**PAPEL DO TOLL LIKE RECEPTOR 4 (TLR-4) NA RESPOSTA LIPOLÍTICA
MEDIADA PELO EXERCÍCIO EXAUSTIVO AGUDO**

Presidente Prudente – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Campus de Presidente Prudente

CAROLINA CABRAL SANTOS

**PAPEL DO TOLL LIKE RECEPTOR 4 (TLR-4) NA RESPOSTA LIPOLÍTICA
MEDIADA PELO EXERCÍCIO EXAUSTIVO AGUDO**

Tese apresentada ao FCT- Universidade Estadual Paulista Campus de Presidente Prudente, para Defesa Pública de Doutorado em Ciências da Motricidade, área Biodinâmica da Motricidade Humana e linha de pesquisa em Fisiologia Endócrino-Metabólica e Exercício.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Santos de Lira

Co-orientador: Prof Dr José Cesar Rosa Neto

Presidente Prudente – SP

2021

C117p

Cabral-Santos, Carolina

Papel do Toll-like Receptor 4 (TLR-4) na resposta lipolítica
mediada pelo exercício exaustivo agudo / Carolina Cabral-Santos. --
Presidente Prudente, 2021

64 p. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente

Orientador: Fabio Santos Lira

Coorientador: Jose Cesar Rosa Neto

1. Toll like receptor 4. 2. Exercícios Físicos. 3. Inflamação. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PAPEL DO TOLL LIKE RECEPTOR 4 (TLR-4) NA RESPOSTA LIPOLÍTICA MEDIADA
PELO EXERCÍCIO EXAUSTIVO AGUDO

AUTORA: CAROLINA CABRAL SANTOS

ORIENTADOR: FÁBIO SANTOS DE LIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS DA
MOTRICIDADE, área: Biodinâmica da Motricidade Humana pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FÁBIO SANTOS DE LIRA (Participação Virtual)
Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

Prof. Dr. ADELINO SANCHEZ RAMOS DA SILVA (Participação Virtual) VIDEOCONFERÊNCIA
Escola de Educação Física e Esporte / Câmpus de Ribeirão Preto da USP

Prof. Dr. RONALDO VAGNER THOMATIELI DOS SANTOS (Participação Virtual) VIDEOCONFERÊNCIA
Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Biociências - Baixada Santista - Santos/SP

Profa. Dra. PATRÍCIA CHIMIN PERANDINI (Participação Virtual) VIDEOCONFERÊNCIA
Departamento de Fundamentos da Educação Física / Universidade Estadual de Londrina Profa.

Dra. LILA MISSAE OYAMA (Participação Virtual) VIDEOCONFERÊNCIA
Departamento de Fisiologia / Universidade Federal de São Paulo - SP

Presidente Prudente, 25 de junho de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares e amigos pelo incentivo e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Santos de Lira e Prof. Dr. José César Rosa Neto, que me concederam a oportunidade de ampliar a minha formação acadêmica, me auxiliando no processo desde a elaboração até a execução deste estudo.

Aos doutorandos, mestrandos e ICs membros do LAFICE (FCT-UNESP) e do Laboratório de Imunometabolismo (ICB-USP), que participaram de forma direta ou indiretamente, pela disposição e ajuda nas coletas de dados, análises e demais processos que propiciaram a realização desse estudo.

Agradeço a todo apoio prestado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o Processo nº 2015/26148-0, para o desenvolvimento dessa pesquisa e pela bolsa de estudos.

Epígrafe

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará a seu tamanho original” - Albert Einstein

RESUMO

O exercício exaustivo, realizado de maneira contínua em intensidade moderada, pode acometer em elevação nas concentrações de ácidos graxos livres, principalmente mediados pela resposta neuroendócrina. Concomitante a esta condição, foi postulado que a endotoxemia favorece a ativação da resposta inflamatória via receptores do tipo Toll-like receptor 4 (TLR-4) em diferentes tipos celulares, favorecendo a produção de citocinas como a Interleucina 6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Adicionalmente, especula-se que a ativação do TLR-4 durante exercício exaustivo pode favorecer o processo de lipólise no tecido adiposo aumentando assim a disponibilidade de ácidos graxos circulantes, no entanto, essa hipótese nunca foi testada. Frente a esta questão, o objetivo do presente projeto foi verificar a relação do TLR-4 e o processo de lipólise induzido pelo exercício exaustivo. Foram utilizadas duas linhagens de animais: Wild Type C57BL/6J e TLR-4 nocaute subdivididos em 4 grupos (n=8 por grupo), quais sejam: 1- grupo controle não exercitado (Rest); 2- grupo exercício exaustivo com eutanásia imediatamente após exercício (0h); 3- exercício exaustivo 2h após exercício (2h); 4- exercício exaustivo 6h após exercício (6h). A sessão de exercício consistiu de 50 minutos de corrida em esteira rolante a 60% da Velocidade Máxima, imediatamente seguida de incremento de 1m/min até a exaustão voluntária. Foram avaliados o perfil metabólico (concentrações de glicose, lactato e ácidos graxos livres) e inflamatório dos tecidos adiposos mesentérico e Retroperitoneal) para determinar o papel do TLR-4. O grupo Wild-Type apresentou uma diminuição nas concentrações de ácidos graxos livres circulantes 6h após o exercício ($p=0,029$; $\eta^2=0,136$) que não foi observado no grupo TLR-4 nocaute. O grupo TLR-4 apresentou valores elevados no conteúdo de triacilglicerol muscular imediatamente após o exercício ($p=0,0001$; $\eta^2=0,370$), com decaimento contínuo até 6h ($p=0,040$; $\eta^2=0,142$). Além disso, o grupo TLR-4 nocaute não apresentou elevação nas concentrações de IL-10 após o exercício quando comparado com o grupo Wild-Type ($p=0,002$) no depósito mesentérico. Tomados em conjunto, nossos dados demonstram importante participação do TLR-4 sobre a utilização do substrato energético. Além disso, observou-se uma possível participação do TLR-4 atuando na liberação aguda das citocinas TNF- α e IL-10. **Palavras chaves:** Toll-like receptor 4, exercício, metabolismo, inflamação, fatores transcricionais.

Abstract

Role of Toll Like Receptor 4 in acute exhaustive exercise-mediated lipolytic response.

The exhaustive exercise, carried out at moderate intensity, can affect elevations in free fatty acid concentrations, mainly mediated by the neuroendocrine response. Concomitant to this condition, it was postulated that endotoxemia favor the activation of the inflammatory response via Toll-Like Receptors (TLR), specifically TLR-4, in different cell types, favoring the production of cytokines such as interleukin 6 (IL-6) and Tumoral necrosis factor alpha (TNF- α). Additionally, it is speculated that the activation of TLR-4 during exhaustive exercise may favor the lipolysis process in adipose tissue thus increasing the availability of circulating fatty acids, however, this hypothesis has never been tested. In view of this, the objective of the present project will be to verify the relationship of TLR-4 and the process of lipolysis induced by the exhaustive exercise. To do this, the project will use two animal strains: C57BL/6J and TLR-4 knockout animal. For each animal lineage 4 subgroups will be formed, containing 8 animals in each one, namely: 1- sedentary control group (Rest); 2- exhaustive exercise group with euthanasia immediately after exercise (0h); 3- exhaustive exercise 2h after exercise (2h); 4- exhaustive exercise 6h after exercise (6h). The metabolic profile (glucose, lactate and free fatty acid concentrations) and inflammatory activity, as well as activity of lipolytic enzymes in the mesenteric and retroperitoneal adipose tissue, will be evaluated to determine the role of TLR-4. Saline group showed a decreased circulating free fatty acid concentration 6h after exercise ($p=0.029$; $\eta^2=0.136$) that was not observed in the TLR-4 knockout group. The TLR-4 group showed high values in muscle-triacylglycerol content immediately after exercise ($p=0.0001$; $\eta^2=0.370$), and that continuously decay until 6h ($p=0.040$; $\eta^2=0.142$). Furthermore, the TLR-4 knockout group showed no increases in IL-10 levels after exercise when compared to Saline group ($p=0.002$) in the mesenteric deposit. In summary, our data demonstrate an important role of TLR-4 on substrate preferences. Furthermore, it was observed a possible participation of TLR-4 in the acute release role of the cytokines TNF- α and IL-10. **Keywords:** Toll-like receptor 4, exercise, metabolism, inflammation, transcriptional factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lipólise do tecido adiposo.....	21
Figura 2. Concentrações de citocinas e liberação de glicerol PPAR- α	24
Figura 3. Desenho experimental	31
Figura 4. Histologia.....	38
Figura 5. Efeito da deleção do TLR-4 sobre as concentrações sanguíneas de lactato, glicose, triacilglicerol e ácidos graxos livres de animais Wild Type e TLR-4 knockout após exercício exaustivo agudo.....	39
Figura 6. Conteúdo de triacilglicerol no músculo gastrocnêmio após exercício exaustivo agudo.....	40
Figura 7. Dosagem da enzima lactato desidrogenase após exercício exaustivo agudo.....	41
Figura 8. Conteúdo de glicogênio do músculo sóleo e do fígado em camundongos após exercício exaustivo.....	42
Figura 9. Ensaio de lipólise basal	42
Figura 10. Efeito da deleção do TLR-4 sobre as concentrações de citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 de animais Wild Type e TLR-4 nocaute após exercício exaustivo agudo.....	44
Figura 11. Figura esquemática das diferentes vias com participação na lipólise durante o exercício exaustivo	46
Figura 12. Concentrações sanguíneas de lactato, glicose, triacilglicerol e ácidos graxos livres de animais Wild Type tratados com beta-bloqueador adrenérgico (10mg/kg de peso	

de Propranolol) após exercício exaustivo agudo.....62

Figura 13. Concentrações de citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 de animais Wild Type tratados com beta-bloqueador adrenérgico (10mg/kg de peso de Propranolol) após exercício exaustivo agudo.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de composição corporal e de desempenho no exercício exaustivo das amostras.....	36
Tabela 2. Parâmetros de composição corporal e de desempenho no exercício exaustivo do grupo Propranolol.....	60

LISTA DE ABREVIações

AGL	Ácidos graxos livres
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATGL	Lipase de triacilglicerol do adipócito
ATP	Adenosina trifosfato
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GLUT-4	Transportador de glicose 4
HSL	Lipase hormônio sensível
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
JNK	Enzima c-Jun N-terminal quinase
KOH	Hidróxido de potássio
LDH	Lactato Desidrogenase
LPL	Enzima lipase de lipoproteína
LPS	Lipopolissacarídeos
MGL	Lipase Monoacilglicerol
MEAT	Tecido adiposo mesentérico
MyD88	Gene de diferenciação mielóide de resposta primária 88
Na₂SO₄	Sulfato de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
PDH	Complexo piruvato desidrogenase
PLIN1	Perilipinas
PI3K	Enzima Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase A
REAT	Tecido adiposo retroperitoneal
TLR-4	Toll Like Receptor 4
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAF-6	Fator associado ao receptor de necrose tumoral 6

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIACÕES	13
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivos Gerais	29
3.2. Objetivos Específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Animais.....	29
4.2. Desenho experimental	30
4.3. Protocolo de Velocidade Máxima	31
4.4. Sessão de Exercício Exhaustivo	32
4.5. Análise Plasmática.....	32
4.6. Coleta Tecidual.....	32
4.7. Ensaio de Lipólise	33
4.8. Histologia.....	33
4.9. Conteúdo de Triacilglicerol Muscular	34
4.10. Conteúdo de Glicogênio Hepático e Muscular	35
4.11. Análise Estatística.....	35
5. RESULTADOS	36

5.1. Composição Corporal e <i>Performance</i>	36
5.2. Perfil Metabólico	38
5.3. Conteúdo de Triacilglicerol Muscular	40
5.4. Atividade da Lactato Desidrogenase	41
5.5. Conteúdo de Glicogênio	41
5.6. Ensaio de Lipólise	42
5.7. Concentrações de citocina	43
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS.....	56
9. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	61

1. INTRODUÇÃO

O exercício físico agudo promove perturbações no metabolismo e em mediadores lipídicos, induzindo a transcrição de genes e a síntese de proteínas que influenciam diretamente na produção de citocinas e adipocinas, levando à uma resposta inflamatória local e sistêmica (Teixeira et al., 2016) sendo estas secreções dependentes da intensidade, duração e quantidade de massa muscular envolvida no exercício físico. Durante a realização do exercício aeróbio com intensidade moderada de 65% a 85% do volume de oxigênio máximo ($VO_{2máx}$), há o estímulo da atividade do sistema nervoso simpático e a liberação de catecolaminas circulantes, que aumentam linearmente com a duração do exercício. Este aumento nas concentrações de catecolaminas visa realizar ajustes cardiovasculares, tais como o aumento da frequência cardíaca e pressão sanguínea, e a disponibilização de substratos energéticos (Zouhal et al., 2008). A regulação da lipólise é mediada por fatores hormonais (como a insulina e o glucagon) e/ou fatores neurais e ativação das catecolaminas adrenalina e noradrenalina - liberadas na corrente sanguínea em resposta ao estresse físico, que estimulam os receptores β -adrenérgicos para que possam mobilizar ácidos graxos (AG) do tecido adiposo branco, para que ocorra a manutenção da atividade (Stallknecht et al., 2001).

A ativação dos receptores adrenérgicos nos tecidos-alvos pelas catecolaminas resulta na interação entre as proteínas estruturais que recobrem as gotículas lipídicas, diferentes lipases e seus coativadores (Goodman, 2009). Assim, as proteínas estruturais conhecidas como perilipinas (PLIN1) pertencem à família de fosfoproteínas hidrofóbicas e atuam como uma barreira à ação das lipases. Quando são fosforiladas pela proteína quinase A (PKA), as PLIN1 perdem a sua capacidade de bloqueio, facilitando assim a ação das lipases em

hidrolisar o TAG da gotícula lipídica e liberar as moléculas de AGL e glicerol (Nielsen et al., 2014) e disponibilizando esse substrato na corrente sanguínea. Desse modo, a fosforilação aumentada da lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL), por exemplo, inicia a lipólise hidrolisando o triacilglicerol (TAG) que resultará em diacilglicerol. Sequencialmente, o diacilglicerol é hidrolisado pela lipase hormônio sensível (HSL) em monoacilglicerol. Posteriormente, este monoacilglicerol é hidrolisado pela lipase de monoglicerídeos (MGL) em glicerol (Mcgarr et al., 1976), sendo que cada um desses processos resulta na liberação de uma molécula AGL.

O tecido adiposo branco é um tecido especializado, cuja principal função é a reserva de energia e armazenamento de gorduras, entretanto, observou-se que os adipócitos são células altamente secretoras - devido a sua capacidade de se comunicar com outros tecidos e o sistema imunológico por meio de secreção de peptídeos, lipídeos e miRNAs - e que a heterogeneidade dos seus depósitos contribui diferentemente tanto para a homeostase quanto a modulação da inflamação (Goodman, 2009; Kahn et al., 2019). Diante do exposto, Rosa-Neto et al (2009) observaram que após uma sessão de exercício exaustivo (corrida a 70% $V_{m\acute{a}x}$ por 50 min e incremento de 1 m/min a cada minuto até a exaustão) a expressão de mRNA e o conteúdo protéico de Interleucina 10 (IL-10) e a razão Fator de necrose tumoral alfa e IL-10 (IL-10/TNF- α) induziu um efeito anti-inflamatório nos músculos extensor longo dos dedos (EDL) e sóleo, especialmente nas fibras do tipo 2. Todavia, os autores observaram efeito pró-inflamatório das citocinas Interleucina 6 (IL-6) e TNF- α no tecido adiposo, as quais possivelmente contribuiriam para o aumento da lipólise, aumentando a disponibilidade de substrato para os músculos esqueléticos para a manutenção da atividade contrátil durante o exercício. Posteriormente, o mesmo grupo publicou um estudo demonstrando que, no tecido adiposo retroperitoneal, as concentrações de Toll-like receptor 4 (TLR-4), o gene 88

da resposta primária de diferenciação mieloide (Myd-88) e I κ B α permaneceram elevadas até 2 horas após o exercício, enquanto que no tecido adiposo mesentérico o receptor 6 associado ao fator de necrose tumoral (TRAF-6) Myd-88 permaneceram elevados por até 6 horas em comparação com o grupo não exercitado, demonstrando que o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos adiposos poderia ser mediado via sinalização de TLR-4, levando a aumentos na atividade nuclear de fator de transcrição via fator nuclear kappa B (NF- κ B).

Neste contexto, destaca-se que os TLRs são receptores presentes na membrana plasmática que desempenham papel crucial na defesa do hospedeiro contra os processos infecciosos e inflamatórios, na manutenção da homeostase e em diversas doenças. São responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos expressos por um amplo espectro de agentes infecciosos, como bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus DNA e RNA, protozoários e fungos, e agem através da ativação da resposta imunológica pelos fatores de transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Wu et al., 2015).

Tem sido demonstrado que o LPS se acopla aos receptores TLR-4 ativando a produção de polipeptídeos com papel imunorregulatório - denominados citocinas pró-inflamatórias - principalmente o TNF- α (representado pela Figura 1) (Rosa Neto et al., 2009; Teixeira et al., 2016). Nesse contexto, foi demonstrado que camundongos nocaute para TLR4 ou com uma mutação inativadora no gene que codifica essa proteína, ficaram protegidos da resistência à insulina e a ativação das serinas quinases IKK β e JNK, induzidas por uma dieta hiperlipídica, sugerindo que o TLR-4 seja provavelmente o modulador chave no cross-talk entre a via metabólica e inflamatória (Kim et al., 2007; Nguyen et al., 2007).

Entretanto, Lira et al (2008) após protocolo de treinamento crônico (corrida em esteira

5 dias por semana a 55-65% do VO₂max, durante 8 semanas) observou-se o aumento na concentração de IL-10 (1,5 vezes) e da razão IL-10/TNF- α no tecido adiposo mesentérico do grupo treinado quando comparado com os animais sedentários, sugerindo que esse efeito pró-inflamatório observado no tecido adiposo seria temporário. Os autores observaram ainda que esse efeito anti-inflamatório do treinamento físico estava associado ao recrutamento reduzido de macrófagos M1 e, conseqüentemente, redução de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo de camundongos (Lira et al., 2008). Portanto, hipotetizamos que durante exercício, principalmente exaustivo, tais citocinas favoreceriam o processo lipolítico, aumentando a disponibilidade de ácidos graxos liberados para a corrente sanguínea e que podem ser captados com substrato à musculatura esquelética para manutenção da atividade contrátil, criando um “looping” imuno-metabólico contínuo. Além disso, o excesso de ácidos graxos livres circulantes podem induzir a resposta parácrina e a liberação de citocinas inflamatórias potencializando o processo de lipólise, uma vez que essas citocinas elevam a atividade da ATGL e HSL, contribuindo para o aumento de mais AGL e gerando assim o ciclo lipólise-inflamação (Teixeira et al, 2016).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lipólise e o Exercício Físico

Durante o exercício agudo de intensidade moderada ($\sim 65\%$ $\text{VO}_{2\text{máx}}$), ocorre a transição do estado de repouso do indivíduo e a demanda de energia aumenta dramaticamente, o metabolismo oxidativo é predominante, levando a vários ajustes fisiológicos para a mobilização de ácidos graxos, absorção e oxidação pelo músculo esquelético para suprir a demanda energética necessária para a manutenção da atividade.

O sistema nervoso simpático exerce um importante papel no controle da atividade dos sistemas cardiovascular, respiratório, endócrino e renal, bem como a participação no controle do metabolismo de substratos energéticos durante o exercício (Zouhal et al., 2008), especialmente pela liberação de catecolaminas secretadas que tem ação direta nos órgãos-alvos. A liberação dessas catecolaminas aumenta linearmente conforme a duração do exercício a fim de possibilitar o maior influxo de nutrientes e oxigênio para a musculatura em atividade (Stallknecht et al., 2001).

No tecido adiposo, as moléculas de TAG permanecem envoltas em uma monocamada de fosfolípidios e proteínas associadas e, para que ocorra a lipólise, é necessário o estímulo de uma cascata lipolítica de ordem sequencial de enzimas, quais sejam: a ATGL que realiza a hidrólise do primeiro éster de TAG resultando em diacilglicerol. Posteriormente o diacilglicerol é hidrolisado pela HSL, gerando monoacilglicerol que é finalmente catalisado pela MGL, gerando substrato para a formação de ATP. Uma alteração exacerbada dessas lipases pode levar a um aumento nas concentrações circulantes de AGL e deposição ectópica de TAG e, em estado crônico, promover o desenvolvimento de doenças metabólicas.

Como pode ser observado na figura 2, as PLIN1, proteínas que recobrem as gotículas

lipídicas e servem como uma barreira entre a gotícula lipídica e a lipase, são ativadas com o estímulo da Proteína Quinase A (PKA) e facilita a lipólise da gotícula uma vez que a fosforilação da PLIN1 promove o sequestro do CGI-58 ligado ao ATGL sob condições basais, assim regulando indiretamente a atividade da ATGL (Miyoshi et al., 2006; Nielsen et al., 2015). O ATGL localiza-se sobre as gotículas lipídicas e é responsável por catalisar o processo inicial na hidrólise do TAG, que pode aumentar em até 20 vezes quando há estimulação da PKA (Villena et al., 2004; Zimmermann et al., 2004).

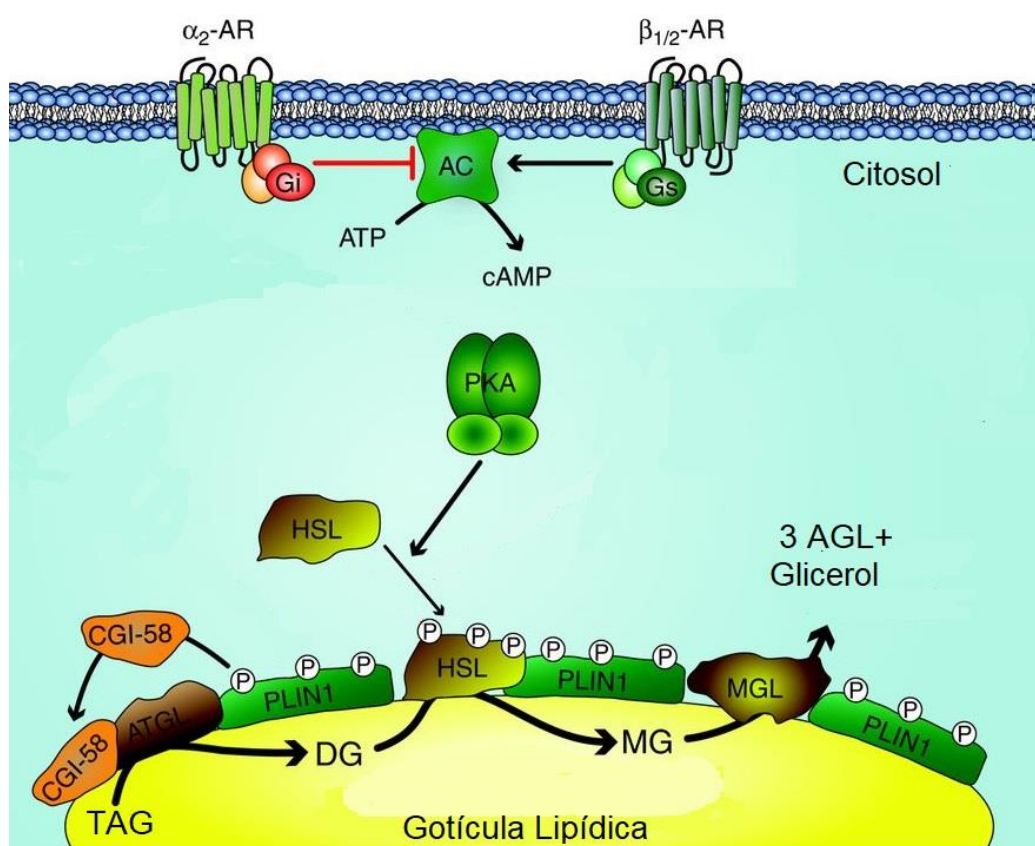


Figura 1. Lipólise do tecido adiposo. A estimulação da lipólise é dependente da fosforilação mediada por proteína quinase A (PKA), do hormônio lipase sensível (HSL) e perilipina (PLIN1). Resumidamente, a estimulação dos receptores beta adrenérgicos ($\beta_{1/2}$ -AR) acoplados à proteína G ativa a adenilato ciclase (AC), que gera adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e ativa PKA. Por outro lado, a ativação de receptores α adrenérgicos (α_2 -

ARs) acoplados à proteína Gi inibe AC e, assim, reduz a sinalização dependente de cAMP para a lipólise. TAG= triglicerídeos; DG= diacilglicerol; AGL= ácido graxo livre; MG= monoacilglicerol; MGL= lipase de monoglicerídeos. As linhas pretas e vermelhas indicam eventos de sinalização pró-lipolítica e anti-lipolítica, respectivamente, enquanto que as setas indicam estimulação e/ou translocação. Adaptado de Nielsen et al., J Mol Endocrinol. 2014;52(3):199-222.

Além disso, foi demonstrado o impacto de diferentes genes sobre o tamanho da gotícula lipídica na ausência de estimulação da PKA, sendo que a expressão de PLIN1 foi positivamente correlacionada com o tamanho da gotícula lipídica. Além disso, a expressão de ATGL altera drasticamente o tamanho da gotícula, o estoque de TAG e a liberação de AGL. Estes resultados proporcionam uma nova perspectiva sobre o papel da ATGL e da PLIN1 na regulação do metabolismo lipídico intracelular e suas funções na regulação do tamanho da célula adiposa (Miyoshi et al., 2006).

É importante destacar que o tecido adiposo é composto, além de adipócitos, por muitos tipos de células incluindo pré-adipócitos, células-tronco mesenquimais, células vasculares e células do sistema imunológico, que também contribuem para sua fisiologia. Adicionalmente, corroborando com a teoria de heterogeneidade funcional do tecido adiposo, estudos têm demonstrado que os tipos de depósitos podem diferir no metabolismo (captação de glicose estimulada por insulina, taxa lipogênica máxima, resposta à catecolaminas e a absorção de ácidos graxos livres), bem como na resposta de citocinas inflamatórias e hormônios de crescimento (Li et al., 2005). O tecido adiposo branco é composto por pelo menos três subpopulações distintas de pré-adipócitos e adipócitos. Os subtipos 1 e 2 são amplamente distribuídos e encontrados em gordura pericárdica, mesentérica, perirenal e perigonadal e são caracterizados por um metabolismo altamente glicolítico, reduzido

acúmulo de triglicerídeos e altamente responsivo às citocinas de caráter pró-inflamatório com maior infiltração de células T citotóxicas e macrófagos no tecido adiposo obeso de camundongos e humanos. Por outro lado, o subtipo 3 que é encontrado principalmente em depósitos subcutâneos são sensíveis à insulina e exibem uma resposta atenuada às citocinas (Li et al., 2005; Kahn et al., 2019).

2.2 Toll-like Receptors 4 e a Resposta Inflamatória

Inicialmente, sabe-se que os AGL atuam como ligantes naturais de vários fatores de transcrição, à exemplo dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) bem como os receptores do tipo Toll 4 (TLR-4) (Dreyer et al, 1993). Os PPAR são fatores de transcrição nucleares que desempenham um importante papel na regulação de genes envolvidos na resposta metabólica (Bays et al., 2004). Quando ativados, especificamente a isoforma alfa (PPAR α), regulam proteínas e enzimas necessária na resposta inflamatória, na oxidação de ácidos graxos e no metabolismo de lipídios, durante os estados de alimentação e jejum, bem como a cetogênese (Ferré, 2004). Este fator de transcrição é expresso em células com alta taxas catabólicas de ácidos graxos, como coração, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo marrom (Escher, 2001; Grabacka et al., 2016).

Resultados prévios do nosso grupo demonstraram que camundongos nocautes para PPAR- α (PPAR- $\alpha^{-/-}$) submetidos à exercício aeróbio agudo, composto por uma sessão de corrida em esteira a 60% da velocidade máxima (Vmax) por 1h, demonstraram uma homeostase de glicose prejudicada, bem como a resposta anti-inflamatória prejudicada em macrófagos (Silveira et al., 2017). Nesse contexto, ao avaliar o envolvimento do PPAR- α na lipólise do tecido adiposo e seu possível envolvimento na regulação de citocinas, animais PPAR- $\alpha^{-/-}$ submetidos ao mesmo protocolo de exercício agudo (1h corrida a 60% Vmax),

demonstraram que o PPAR- α também atua como um sensor do suprimento de lipídios, após avaliar as alterações metabólicas usando a lipólise como base, observamos uma capacidade prejudicada em estimular a liberação de produtos lipolíticos (glicerol) após estímulo máximo com isoproterenol, sugerindo que a capacidade de lipólise do tecido adiposo foi afetada pela falta de PPAR- α , bem como a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (Figura 3).

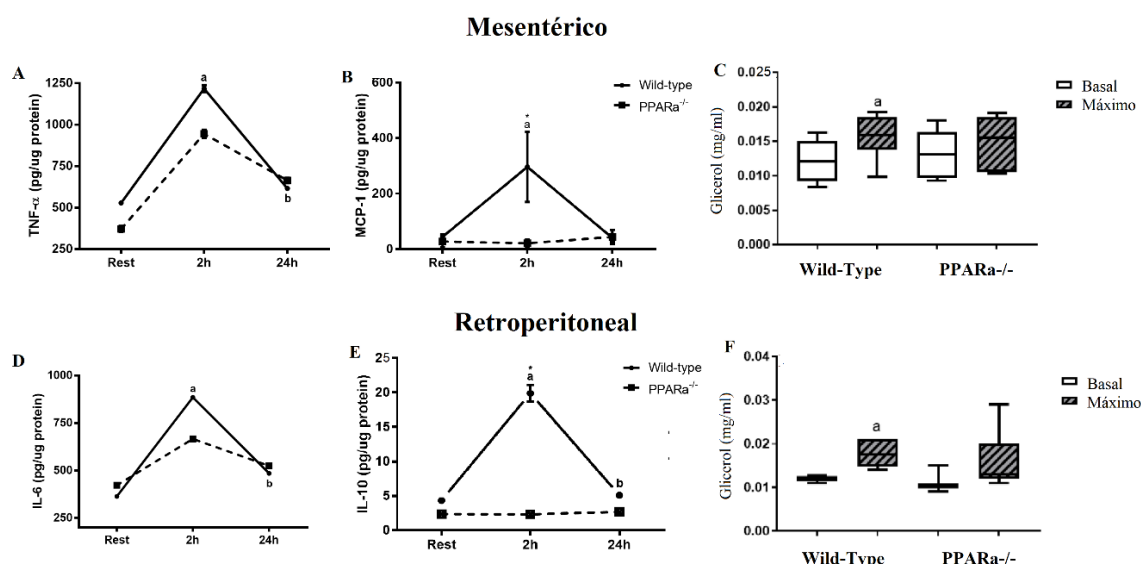


Figura 2. Concentrações de citocinas nos depósitos mesentérico (A-TNF- α , B-MCP-1) e retroperitoneal (D-IL-6 e E-IL-10) bem como o glicerol (C e F) liberado no ensaio de lipólise na ausência (basal) e presença de 10 μ l de isoproterenol (máximo) de animais Wild Type (n=6) e PPAR- $\alpha^{-/-}$ (n=7) nos períodos de repouso (Rest) 2h e 24h após exercício agudo. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. a= diferença significativa do momento basal, b= diferença significativa do momento 2h após exercício. Referência: Cabral-Santos et al, Cytokine 2020;134:155207.

Como descrito anteriormente, o outro importante ligante dependente de AGL são os TLRs, uma família de proteínas transmembranas que atuam no sistema imunológico do hospedeiro contra processos infecciosos e inflamatórios e atuam na fase inicial de

reconhecimento de diferentes patógenos como bactérias, DNA e RNA de vírus, protozoários ou fungos (Ferraz et al., 2011). Esse nome é devido a sua similaridade com Toll, proteína essencial na imunidade da mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) contra fungos (Medzhitov et al., 1997). Esses receptores têm como função detectar e reconhecer estruturas microbianas derivados de patógenos, referidos como padrões moleculares associados a patógenos (Gleeson et al., 2006) e no encaminhamento de sinais que levam a ativação da resposta imunológica (Ferraz et al., 2011).

Sabe-se que a liberação de endotoxina derivada da flora intestinal pode ser considerada um gatilho na resposta inflamatória devido ao seu estímulo na secreção de fatores pró-inflamatórios. O principal ligante do TLR-4 é a parte da membrana da bactéria constituída de lipopolissacarídeos (LPS), conhecido também como endotoxina, que ao ser ativado desencadeia uma sinalização em cascata com duas proteínas chaves nesse processo: o Gene de diferenciação mielóide de resposta primária 88 (Myd88) e Fator associado ao receptor de necrose tumoral 6 (TRAF-6) (Kawai e Akira, 2006). Em circunstâncias normais, apenas pequenas quantidades de endotoxina são translocadas do lúmen intestinal para a circulação sistêmica, e essa pequena parcela que consegue atravessar é absorvida rapidamente, e removida por monócitos e células de Kupffer no fígado. Porém, em condições adversas (como sepse ou trauma) o LPS é um potente indutor de inflamação. Durante a resposta inflamatória, o TLR-4 induz a ativação de fatores de transcrição via NF- κ B que se encontra no citoplasma ligado a uma proteína inibitória que impede sua translocação para o núcleo, mas quando ativado pode culminar no aumento da expressão e liberação de marcadores pró-inflamatórios, como as citocinas Interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6, e TNF- α (Schaeffler et al., 2009; Wu et al., 2015).

Assim como a musculatura esquelética e o fígado, o tecido adiposo também expressa

o receptor de TLR-4 (Francaux et al., 2009). Porém, estudos sugeriram que no tecido adiposo o TLR-4 poderia ser ativado tanto por LPS como por via dependente de AGL e que a exposição celular de LPS e AG simultaneamente amplificou a resposta inflamatória (Yang et al., 2006). Assim, a elevação persistente destes, como ocorre muitas vezes no indivíduo obeso, tem impacto substancial como fator desencadeador da inflamação associada com a resistência à insulina e desordens cardiovasculares (Lafontan, 2014), além de alterar a secreção de citocinas pró-inflamatórias via TLR-4 (Rosa et al., 2009).

Olesen et al (2015) observaram o aumento sistêmico e na expressão gênica de IL-6 e TNF- α em biópsia no músculo vasto lateral e do tecido adiposo subcutâneo após tratamento com LPS (0.3 ng E. coli LPS/kg), porém observaram que em indivíduos fisicamente treinados houve um retardamento e/ou diminuição da inflamação aguda quando comparado com os sedentários, sugerindo que o exercício físico realizado de forma crônica poderia diminuir a expressão de receptores de TLR-4 em diversos tecidos. Desse modo, o equilíbrio entre a ativação e inativação dos receptores de TLR deve estar finamente regulado a fim de que se evite uma resposta imunológica muito baixa ou excessiva - como visto no caso de susceptibilidade a patógenos e/ou doenças crônicas inflamatórias e autoimunes, respectivamente. (Ferraz et al., 2011)

Comprovou-se que o exercício aeróbio exaustivo promove elevação nas concentrações de AGL, os quais podem, pelo menos em partes, ativar a resposta inflamatória via TLR-4 estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias após exercício, principalmente no tecido adiposo, gerando assim um ambiente pró-inflamatório (Rosa-Neto et al 2009). Sendo assim, além de promover o reparo e remodelamento tecidual após o trauma, foi demonstrado que a indução da resposta inflamatória via proteínas de fase aguda e pró-inflamatórias estimulam o processo de lipólise - como ocorre no aumento das concentrações de TNF- α ,

que é importante regulador dos processos metabólicos durante o exercício capaz de atuar sobre o metabolismo lipídico. Esta ação aumenta a disponibilidade de AGL na circulação através do processo de lipólise, via mecanismo dependente da HSL e modifica o padrão de PLIN1 no tecido adiposo (Cawthorn et al., 2008). Ainda, diminui a expressão da enzima lipase de lipoproteína (LPL) neste tecido, a hidrólise dos triacilglicerol das lipoproteínas (quilomícrons e VLDL), e a captação e acúmulo de AGL (Yang et al., 2006).

O TNF- α é uma substância imunomoduladora que exerce importante função no quadro da resistência à insulina, uma vez que sua elevação crônica induz a fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) em resíduos de serina e treonina, e a atividade da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), com diminuição da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana podendo causar prejuízos na sinalização da insulina, tanto em adipócitos como em miócitos (Hotamisligil, 1996).

Entretanto, foi demonstrado que a resposta inflamatória durante o exercício e a elevação aguda de ambas as citocinas, IL-6 e TNF- α , (diferentemente da elevação crônica) estimulariam o processo de lipólise e são importantes reguladores dos processos metabólicos durante o exercício com capacidade de atuar sobre o metabolismo. Fischer (2006) demonstrou que a IL-6 sintetizada e liberada durante o exercício físico induz diferentes processos metabólicos via sinalização por AMPK e PI3K-AKT, induzindo a lipólise no tecido adiposo e a produção de gliconeogênese hepática para manutenção da atividade contrátil. O principal estímulo da síntese e liberação da IL-6, além da contração muscular das fibras, parece ser uma queda no conteúdo de glicogênio muscular, aumentos nas concentrações de cálcio intracelular e o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), que ativam fatores de transcrição que são conhecidos por regular a síntese de IL-6 (Fischer, 2006). Entretanto, durante o período de recuperação, as alterações

fisiológicas e inflamatórias visam atender as necessidades energéticas de restauração das concentrações sanguíneas de oxigênio e o reabastecimento dos fosfagênios utilizados - como ATP e creatina fosfato (CP) que pode ser utilizada na ressíntese de ATP.

Por fim, a real participação do TLR-4 sobre os eventos moleculares envolvidos no processo de lipólise é desconhecida. Frente ao exposto acima, o exercício aeróbio exaustivo gera quadro de elevada concentração de LPS e AGL, condição que favorece ativação da via inflamatória principalmente pela produção de $\text{TNF-}\alpha$ e, conseqüentemente, poderia estimular o processo de lipólise favorecendo a disponibilidade de AGL para corrente sanguínea, especialmente para manutenção da atividade contrátil ou reposição dos estoques de triacilglicerol intramuscular.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Objetivo deste estudo consiste em determinar a participação do TLR-4 frente à resposta da lipólise após exercício exaustivo agudo.

3.2. Objetivos específicos

- a) Verificar os efeitos agudos no perfil inflamatório após exercício exaustivo através de possíveis alterações no conteúdo de citocinas relacionadas à resposta anti e pró-inflamatórias, quais sejam: TNF- α , IL-6 e IL-10, até 6 horas após a sessão;
- b) Verificar alterações nas concentrações de ácidos graxos livres após exercício exaustivo;
- c) Avaliar o nível de desempenho do animal que não possui o gene para o TLR-4 comparando com o C57BL6;

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J e C57BL/6 TLR-4 nocaute (TLR-4^{-/-}) com aproximadamente 30-40 dias obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram reproduzidos e mantidos no biotério Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento - ICB1/USP em gaiolas coletivas (com dois a três animais) forradas com maravalha. A luminosidade foi controlada com ciclo claro-escuro de 12h e temperatura

ambiente entre 20 e 24° C. Foi oferecido dieta normal (ração Nuvital da Nuvilab, Colombo, PR) e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos obedecem às Normas e Princípios Éticos de Experimentação Animal e esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT-UNESP, Câmpus Presidente Prudente) sob o número de Protocolo 02/2016.

4.2. Desenho Experimental

Com idade de aproximadamente 10 semanas, os camundongos de cada uma das linhagens e/ou tratamento foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=8 por grupo) conforme a Figura 3, quais sejam:

- Controle (Rest): os animais permaneceram em suas gaiolas, com água e alimentação à vontade e não realizaram nenhum exercício físico;
- Exercitado (0h): os animais foram submetidos a exercício aeróbio exaustivo e foram sacrificados por anestésico inalante (Isoflurano) e decapitados imediatamente após a sessão aguda de exercício;
- Exercitado (2h): os animais foram submetidos a exercício aeróbio exaustivo e sacrificados duas horas após a sessão aguda de exercício;
- Exercitado (6h): os animais foram submetidos a exercício aeróbio exaustivo e sacrificados seis horas após a sessão aguda de exercício.

Previamente ao protocolo, os animais realizaram jejum 1h antes da sessão de exercício

que ocorreu no período das 9h e, logo após a sessão, estes permaneceram em suas gaiolas no biotério e em restrição alimentar até o período do respectivo sacrifício, com acesso à vontade de água apenas.



Figura 3. Desenho experimental.

4.3. Protocolo para Determinar a Velocidade Máxima

Os camundongos foram submetidos a uma semana de adaptação a corrida na esteira rolante motorizada (AVS Projetos) que consistiu de uma sessão de 10 minutos por dia e em intensidade leve (10 metros/minuto).

Para determinação da velocidade máxima os animais foram submetidos ao teste de exercício incremental em esteira. O protocolo consistiu em um incremento de 3m/min a cada estágio de 3 minutos (0% de inclinação) no teste até exaustão voluntária verificada quando o animal não fosse mais capaz de manter a velocidade determinada (Ferreira et al, 2007). Este teste forneceu a distância total executada e a carga de trabalho máxima do teste que possibilitou determinar a velocidade máxima individual (definida como o último estágio completo realizado).

4.4. Sessão de Exercício Exhaustivo

Após 72 do teste de velocidade máxima, na sessão de exercício exaustivo, os animais foram submetidos a uma corrida moderada com duração de 50 minutos na velocidade correspondente a 60% da velocidade máxima (V_{max}). Imediatamente após esse período, houve um incremento de carga de 1 m/min até a fadiga voluntária individual, definida como o momento em que os camundongos não conseguiram mais correr e paravam.

4.5. Análise Sorológicas

As amostras sanguíneas coletadas após a decapitação foram transferidas para tubos de 1.5mL centrifugadas a 2.500 rpm, durante 15 minutos à 4 °C. A seguir, o plasma foi armazenado em tubos plásticos eppendorfs e estocados à -80 °C até a data da análise. As análises bioquímicas foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico e utilizados reagentes de kit comercial para determinação quantitativa de AGL (Wako, 1-2, doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka, Japan), glicose, lactato, triacilglicerol - TAG e lactato desidrogenase - LDH (Labtest®, São Paulo, Brazil) de acordo com as orientações do fabricante. Todas as análises sanguíneas foram realizadas em duplicata para minimizar erros e foi adotado um coeficiente de variação inferior a 10%.

4.6. Coleta tecidual

Para análise de composição corporal, os animais foram pesados imediatamente antes do sacrifício enquanto que o peso final dos tecidos adiposos branco epididimal, subcutâneo, mesentérico e retroperitoneal coletados foram pesados imediatamente após a coleta dos

mesmos (Balança Eletrônica Semi-Analítica, Marte Científica, SP, Brasil).

O tecido adiposo retroperitoneal (RPAT), tecido adiposo mesentérico (MEAT) e os músculos gastrocnêmio e sóleo foram retirados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C para posterior análise. As amostras foram cuidadosamente homogeneizadas em Tampão RIPA (0,625% Nonidet P-40, 0,625% desoxicolato de sódio, 6,25 mM de fosfato de sódio e 1 mM de etilenodiaminotetracético ácido com pH 7.4) contendo $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ de coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína por meio de ensaios de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As citocinas $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL-10 foram avaliadas utilizando o kit comercial de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (R&D Systems, McKinley Place, MN, EUA) de acordo com as orientações do fabricante.

4.7. Ensaio de Lipólise

Amostras dos depósitos mesentérico e retroperitoneal do tecido adiposo dos animais foram incubadas em tampão Krebs/Riger/Fosfato pH7,4 contendo BSA (20mM) e glicose (5mM) por 30 minutos a 37°C com a ausência (basal) ou presença do agonista β -adrenérgico Isoproterenol ($2\mu\text{M}$). Logo após, o meio foi coletado e dosada a liberação de glicerol por ensaio colorimétrico (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canadá), as concentrações de glicerol foram usadas como índice da taxa de lipólise para comparação entre os momentos basais e estimulados.

4.8. Histologia

O gastrocnêmio da pata direita foi coletado e fixado com OCT (Tissue - Tek®; Sakura Finetek, CA) e Tragacanth (Sigma - Aldrich, MO) na posição vertical e congelado em nitrogênio líquido. Cortes transversais (10 µm de espessura) foram obtidos em criostato, montado em lâminas quentes StarFrost (Knittel Glass®, Braunschweig, Alemanha). Foi realizada ainda a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e Sudan Black das lâminas com cortes de tecido muscular.

Para investigação histológica, a captura de imagens de alta qualidade (2048 × 1536 pixels) obtidas do microscópio de luz Nikon Eclipse E800 deu-se por câmera digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) e as áreas de perímetro do músculo gastrocnêmio foram quantificados pelo Software Fiji – ImageJ (Madison, Wisconsin, USA) (Schindelin et al., 2012) e foi efetuado a frequência de distribuição das fibras em função dos seus diâmetros.

4.9. Conteúdo de Triacilglicerol Muscular

Para extração de lipídios no músculo esquelético gastrocnêmio foi utilizado o método proposto por Folch et. al (1976). Os lipídios totais foram extraídos das amostras com uma solução de clorofórmio e metanol (2:1) em tubos de ensaio de vidro. As amostras foram homogeneizadas em politron por 45 segundos e centrifugados a 655,1g por 5 minutos. Após a centrifugação, a camada orgânica foi removida pela técnica da dupla pipeta - o processo foi repetido quando necessário para extração total dos lipídios. O extrato lipídico total foi evaporado sob temperatura ambiente e ressuspendido em Triton 3%. As amostras de lipídios

extraídos foram analisadas quanto ao seu teor de TAG pelo método colorimétrico, utilizando kit comercial (Labtest®). Os resultados foram expressos em mg de TAG por g de tecido.

4.10. Conteúdo de glicogênio hepático e muscular

As análises do glicogênio foram realizadas em duas etapas: extração e quantificação. A extração foi realizada segundo do método de Van Handel et al (1965), através de amostras de tecidos do músculo sóleo e fígado. As amostras foram digeridas em tubos de ensaio contendo solução de 30% de hidróxido de potássio (KOH) e levados em banho fervente por 30 minutos. Após esse período foi adicionado em cada tubo de ensaio uma solução saturada de sulfato de sódio (Na_2SO_4) e etanol a 96% para precipitação do glicogênio, sendo os tubos agitados no vórtex e colocados em gelo por 30 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante descartado - esse processo de centrifugação foi repetido quando necessário. Foi adicionado 50µl de água destilada para ressuspender o precipitado e foi realizada a quantificação de glicose (Labtest®, São Paulo, Brazil) de acordo com as orientações do fabricante. As leituras das amostras foram realizadas em triplicatas.

4.9. Análise estatística

A normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e todos os dados descritivos estão em média e erro padrão (média $\pm$ SD). As variáveis de composição corporal e do exercício exaustivo foram avaliadas pelo teste ANOVA one-way (com intervalos de confiança 95%).

As diferenças entre os grupos e os tempos foram analisadas pelo teste ANOVA de duas vias e quando necessário o post-hoc de Bonferroni. Além disso o tamanho do efeito (Eta-

square; η^2) de cada teste foi calculado para todas as análises. A significância estatística foi estabelecida em 5% e todos os dados foram analisados no SPSS, versão 17.0 (IL, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Composição corporal e desempenho físico

Na Tabela 1 encontram-se as características de composição corporal e do exercício exaustivo agudo. Apesar de não haver diferenças no peso dos animais, o grupo TLR-4 apresentou um Índice de Adiposidade Corporal maior em comparação com o grupo WT (IC95%: 0.04; 0.62, $p=0.018$) porém, quando verificado de maneira isolada os pesos dos tecidos adiposos, observou-se efeito do grupo sobre o RPAT (IC95%: 0.001; 0.020, $p=0.018$) onde o grupo TLR-4 apresentou valores mais elevados. Foi monitorada a ingestão alimentar diária desses animais, porém o consumo médio não diferiu entre os grupos (dados não apresentados).

Após a sessão de exercício exaustivo aguda o grupo TLR-4 apresentou melhor desempenho tanto para $V_{\text{máx}}$ (IC95%: -6.91; -0.81, $p=0.008$) quanto na distância atingida até a exaustão (IC95%: 31.07; 191.84, $p=0.045$) quando comparado com o WT.

Tabela 1. Parâmetros de composição corporal e de desempenho no exercício exaustivo das amostras.

Variáveis	Wild Type Salina	TLR-4 nocaute ^(-/-)
Peso corporal (g)	24,15± 0,32	22,63± 0,66
Índice de adiposidade (%)	1,75 ± 0,04	2,12 ± 0,17 ^a
Subcutâneo (g)	0,153 ± 0,007	0,166 ± 0,011
Retroperitoneal (g)	0,039 ± 0,001	0,040 ± 0,001 ^a
Epididimal (g)	0,235 ± 0,008	0,241 ± 0,016
Mesentérico (g)	0,100 ± 0,006	0,098 ± 0,016
$V_{\text{máx}}$ (m/min)	23,25 ± 0,58	28,25 ± 0,85 ^a
Distância total (m)	794,94 ± 13,53	906,40 ± 12,69 ^a

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. $V_{\text{máx}}$ = velocidade máxima.
Teste ANOVA One-way com nível de significância de $p < 0,05$. a=
diferença significativa do grupo WT Salina.

A Figura 4 apresenta a caracterização das fibras musculares do gastrocnêmio dos grupos. Não foi observado diferenças significativas entre os grupos WT e TLR-4 KO na área média, na distribuição do diâmetro das fibras bem como não houve diferença nos depósitos de gordura intramuscular.

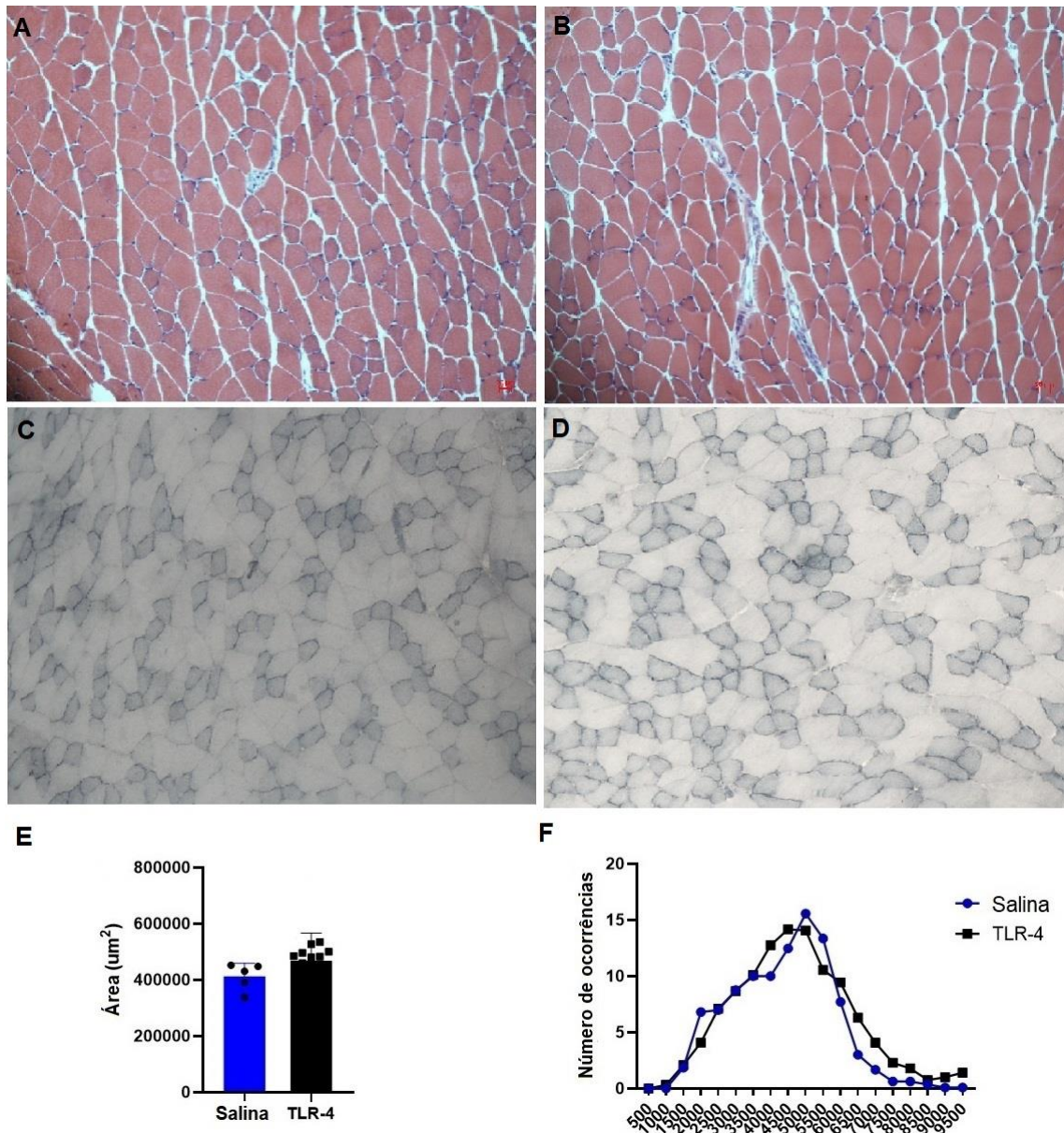


Figura 4. Histologia. Microfotografia representante dos cortes transversais do músculo esquelético gastrocnêmio coradas por hematoxilina e eosina (A= WT e B= TLR-4 KO); Quantidade de lipídios depositados nas fibras pelo método Sudan Black (C= WT e D= TLR-4 KO), ambos com barra=20µm e aumento de 10x; Valores médios da área das fibras (E) e distribuição das fibras de acordo com o diâmetro (F) (média de 690-1134 fibras por animal, n=3 por grupo).

5.2. Perfil metabólico

A deleção do TLR-4 não afetou as concentrações basais de nenhuma das variáveis metabólicas dosadas. Paralelamente, não foi observado diferenças significativas nas concentrações de glicose e lactato entre os grupos ($p>0,05$).

Não foram observados aumentos significativos nas concentrações de AGL após o exercício exaustivo e apesar de todos os grupos apresentarem uma concentração basal similar, a deleção do TLR-4 parece alterar a cinética de AGL nesses animais (Figura 5). O momento 6h apresentou valores menores quando comparado com 0h e 2h após o exercício no grupo WT Salina (Salina: 472.27 ± 39.40 ; TLR-4: 780 ± 89.10 mmol/mL, $p=0.029$; $\eta^2=0.136$). Adicionalmente, não houve efeito da linhagem ou do tempo nas concentrações de lipoproteínas de alta densidade - HDL e de colesterol (dados não apresentados).

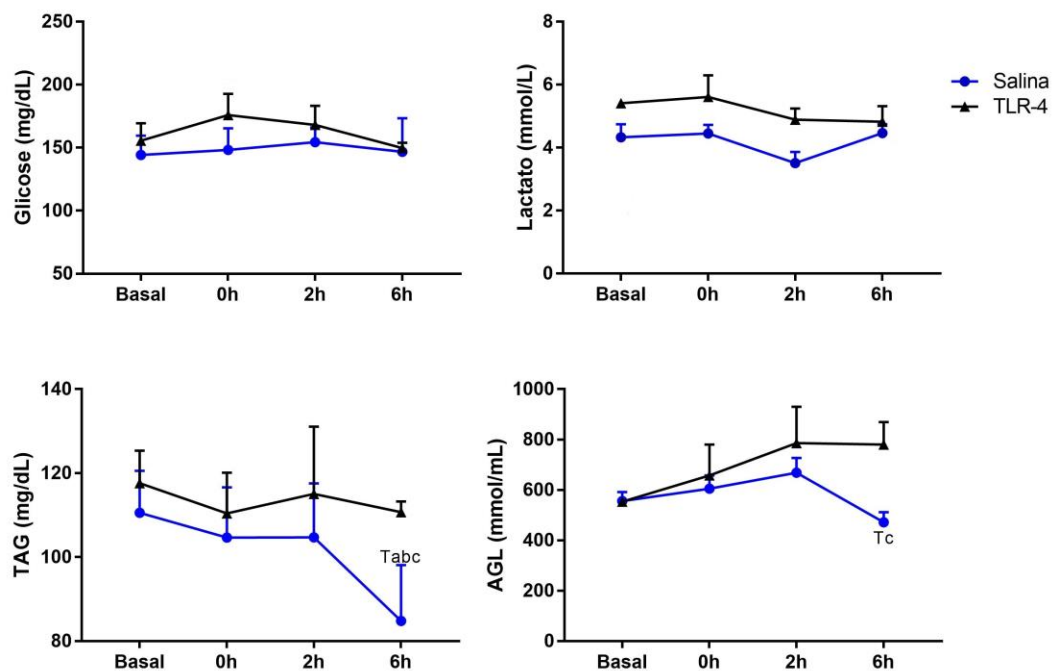


Figura 5. Efeito da deleção do TLR-4 sobre as concentrações sanguíneas de lactato, glicose, triacilglicerol e ácidos graxos livres de animais Wild Type e TLR-4 nocaute após exercício exaustivo agudo. TAG= triacilglicerol; AGL= ácidos graxos livres. a= diferença

significativa do momento basal; b= diferença significativa do momento imediatamente após o exercício; c= diferença significativa do momento 2h pós-exercício; S= diferença significativa do grupo WT Salina; T= diferença significativa do grupo TLR-4.

5.3. Conteúdo de triacilglicerol muscular

A Figura 6 apresenta o conteúdo de triacilglicerol no músculo gastrocnêmio dos animais. Foi observado efeito sobre a linhagem onde o grupo TLR-4 apresentou valores aumentados no momento imediatamente após o exercício quando comparado com o grupo WT Salina (Salina: 0.90 ± 0.04 ; TLR-4: 1.66 ± 0.41 , $p=0,0001$; $\eta^2=0,370$). Porém esses valores apresentam um decaimento contínuo nos momentos 2h e 6h (1.19 ± 0.06 e 0.75 ± 0.06 mg/g de tecido respectivamente, $p=0,040$; $\eta^2=0,142$), apresentando valores inferiores no momento 6h (Salina: 1.05 ± 0.05 ; TLR-4: 0.75 ± 0.06 mg/g de tecido, $p=0.29$; $\eta^2=0,113$)

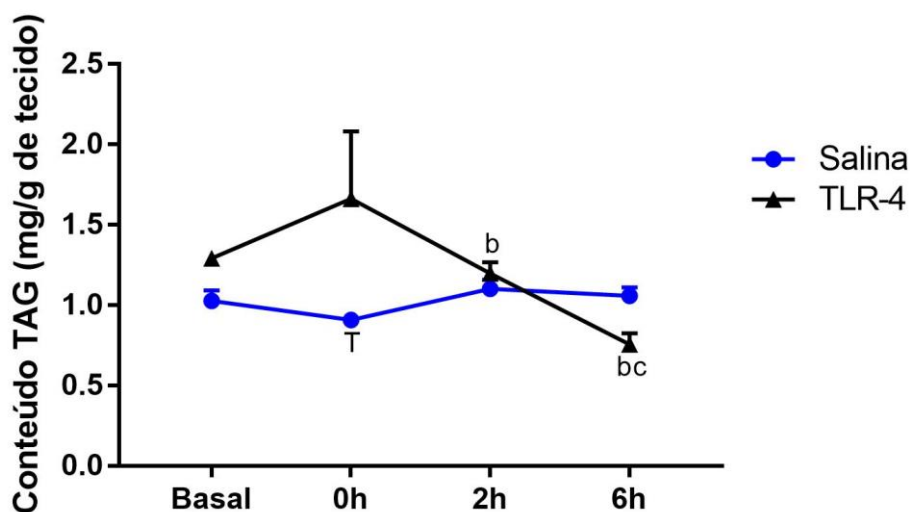


Figura 6. Conteúdo de triacilglicerol no músculo gastrocnêmio após exercício exaustivo agudo. a= diferença significativa do momento basal; b= diferença significativa do momento imediatamente após o exercício; c= diferença significativa do momento 2h pós-exercício; S= diferença significativa do grupo WT Salina; T= diferença significativa do grupo TLR-4.

5.4. Atividade da Lactato Desidrogenase

Quando avaliado a enzima LDH, não foi observado efeito da linhagem e/ou tratamento dos grupos ($p=0.065$; $\eta^2=0.083$, Figura 7).

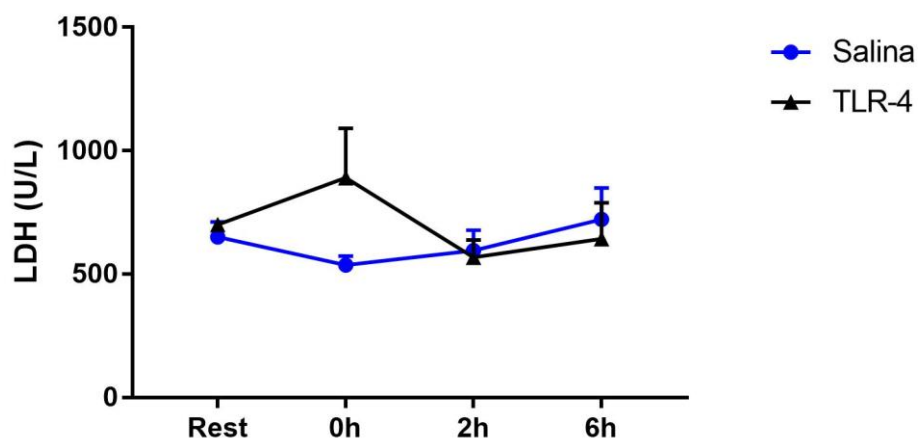


Figura 7. Dosagem da enzima lactato desidrogenase após exercício exaustivo agudo. a= diferença significativa do momento basal; b= diferença significativa do momento imediatamente após o exercício.

5.5. Conteúdo de Glicogênio

A Figura 8 apresenta o conteúdo de glicogênio, que é a reserva energética a curto prazo, do músculo sóleo. Não houve efeito sobre o tempo em nenhuma das linhagens utilizadas ($p=0.065$; $\eta^2=0.111$). Observou-se efeito da linhagem sobre o conteúdo de glicogênio hepático, com valores basais maiores no grupo TLR-4 (88%) do que o grupo Salina (Salina: 23.63 ± 3.28 ; TLR-4: 44.64 ± 6.56 mg/g de tecido, $p=0.004$; $\eta^2=0.363$). O grupo Salina não apresentou nenhuma diferença significativa sobre o conteúdo de glicogênio hepático, enquanto que o grupo TLR-4 apresentou uma queda significativa até 6h após o

exercício quando comparado com o momento basal (Salina: 19.94 ± 1.85 ; TLR-4: 18.06 ± 2.26 , $p=0.001$; $\eta^2=0,423$).

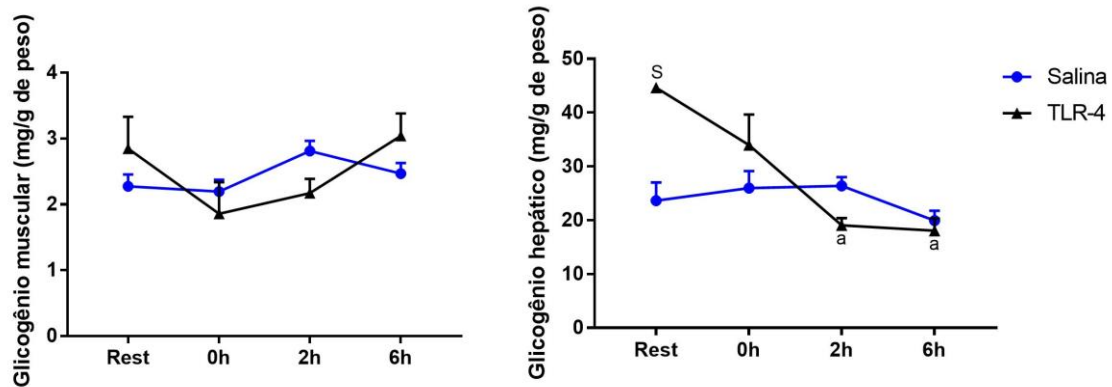


Figura 9. Conteúdo de glicogênio do músculo sóleo e do fígado em camundongos após exercício exaustivo agudo. a= diferença significativa do momento basal; S= diferença significativa do grupo WT Salina;

5.6. Ensaio de Lipólise

Não houve diferenças nas concentrações de glicerol tanto no tecido adiposo mesentérico quanto retroperitoneal dos animais TLR-4 KO ($p=0.62$, Figura 9). Já em relação ao grupo WT, não houve diferenças significativas no retroperitoenal ($p=0,20$). No entanto, a taxa de lipólise máxima (Iso) aumentou no depósito mesentérico quando comparado com as concentrações basais ($p=0.038$, $\eta^2=0,30$).

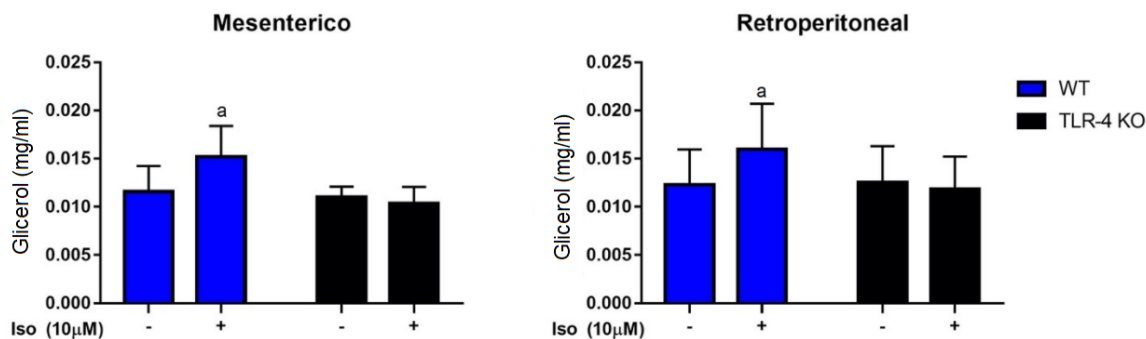


Figura 9. Ensaio de lipólise basal. Glicerol liberado no ensaio de lipólise nos depósitos mesentérico e retroperitoneal do tecido adiposo na ausência e presença de 10 µl de isoproterenol (Iso) dos animais WT e TLR-4 nocaute (n=6 a 9 por gene). Os parâmetros foram normalizados pelo peso do tecido dos animais. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. a= diferença significativa do momento basal.

5.7. Concentrações de Citocinas

No tecido adiposo Retroperitoneal, observou-se efeito da linhagem sobre as concentrações de TNF- α com valores imediatamente pós-exercício menores no grupo TLR-4 (Salina: 319.1 ± 74.11 ; TLR-4: 104 ± 11.4 pg/µg de proteína, $p=0.027$; $\eta^2=0,112$). Não houve diferenças entre a linhagem ou tempo dos animais nas dosagens de TNF- α no tecido adiposo Mesentérico ($p=0.48$; $\eta^2=0.087$, Figura 10).

Para IL-10 mensurada no tecido adiposo Mesentérico houve apenas efeito da linhagem ($p=0.001$; $\eta^2=0.354$), sendo que o grupo TLR-4 apresentou menores valores nos momentos imediatamente pós-exercício (44.90 ± 86.40 pg/µg de proteína) quando comparado com o grupo Salina (513.01 ± 1.48 pg/µg de proteína) assim como nos momentos 2h e 6h pós-exercício ($p=0.002$). No tecido adiposo Retroperitoneal houve apenas diferença entre os grupos Salina e TLR-4 no momento 2h pós-exercício (523.86 ± 102.79 e 62.33 ± 20.73

pg/ μ g de proteína respectivamente $p=0.002$; $\eta^2=0.213$). Além disso, devido ao número de amostras ser pequeno, não observamos diferenças nas dosagens de IL-6 no tecido adiposo mesentérico, ($p=0.101$; $\eta^2=0.116$) e retroperitoneal ($p=0.09$; $\eta^2=0.108$).

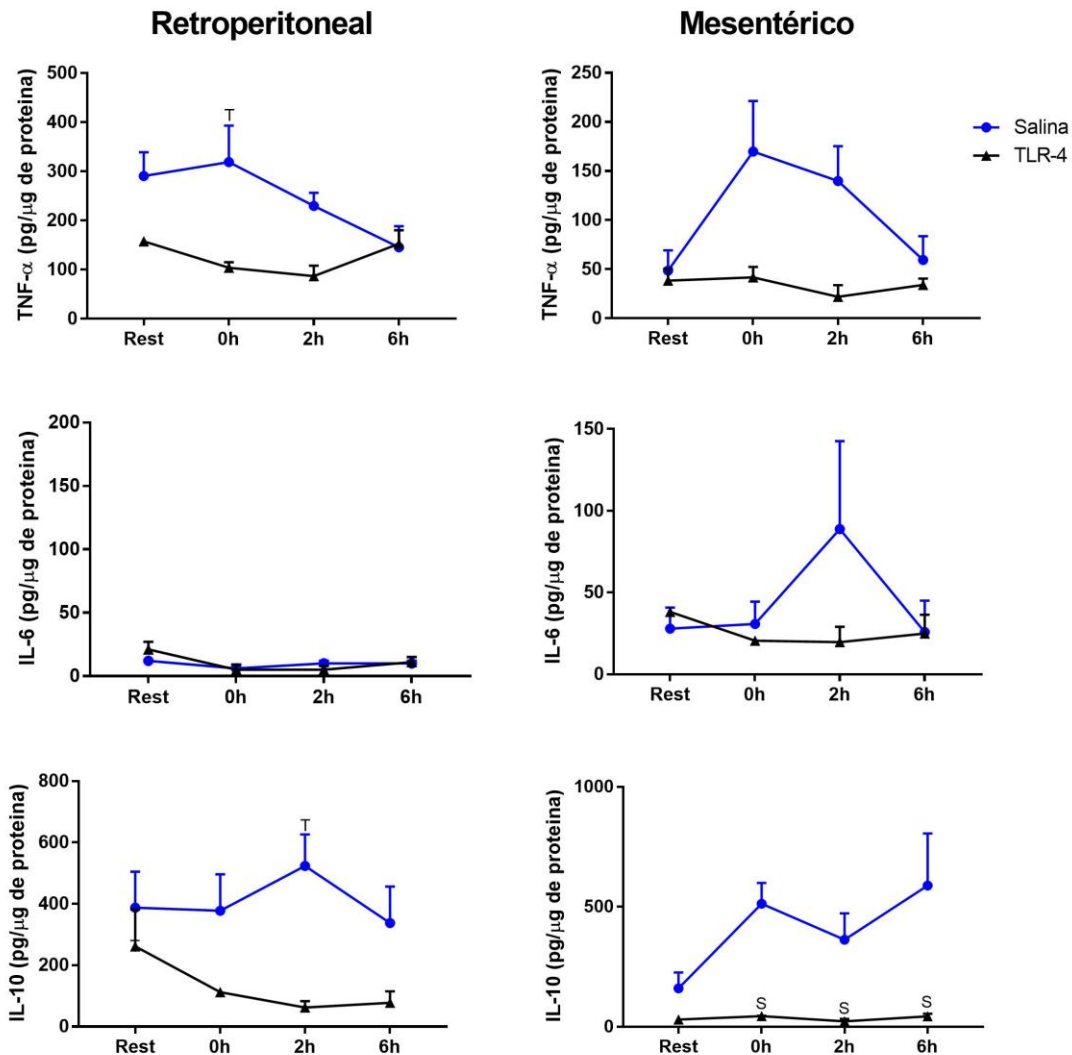


Figura 10. Efeito da deleção do TLR-4 sobre as concentrações de citocinas TNF- α e IL-10 de animais Wild Type e TLR-4 knockout após exercício exaustivo agudo. a= diferença significativa do momento basal; b= diferença significativa do momento imediatamente após o exercício; S= diferença significativa do grupo WT Salina; T= diferença significativa do grupo TLR-4.

6. DISCUSSÃO

A presente tese de doutoramento buscou explorar com maior detalhamento a possível participação da resposta inflamatória, em especial, o papel do TLR-4 no processo de lipólise nos depósitos de tecido adiposo de animais submetidos à sessão de exercício exaustivo (apresentado na Figura 12) uma vez que a intensidade do exercício está diretamente relacionada a eficiência energética. A regulação metabólica é extremamente refinada e complexa. A concentração de glicose no sangue é mantida em concentração constantes em condições basais, porém em condições de baixo fluxo glicolítico, o glicogênio é uma forma de reserva de glicose capaz de ser mobilizada rapidamente.

O sistema aeróbico requer oxigênio para quebrar a glicose a piruvato e a subsequente degradação a CO_2 e H_2O por meio do ciclo do ácido tricarboxílico e do sistema de transporte de elétrons. Porém, quando o suprimento de oxigênio não é suficiente para a demanda energética do exercício exaustivo e/ou maior que a capacidade do sistema aeróbico para promover ATP ocorre uma resposta integrada do sistema anaeróbico - gerando ATP pela hidrólise de glicose (glicólise) ou do glicogênio (glicogenólise) (Freitas e Marangon, 2004).

Assim, o fígado responde diretamente a alterações nas concentrações de glicose e tem uma importante participação na prevenção de hipoglicemia durante períodos de exercício intenso através da captação de lactato e sua conversão para glicose livre que será transportada pela corrente sanguínea para os tecidos extra-hepáticos (Brooks et al., 1999). Além disso, o aumento das concentrações de lactato sanguíneo desempenha um papel central na manutenção da glicemia durante o exercício.

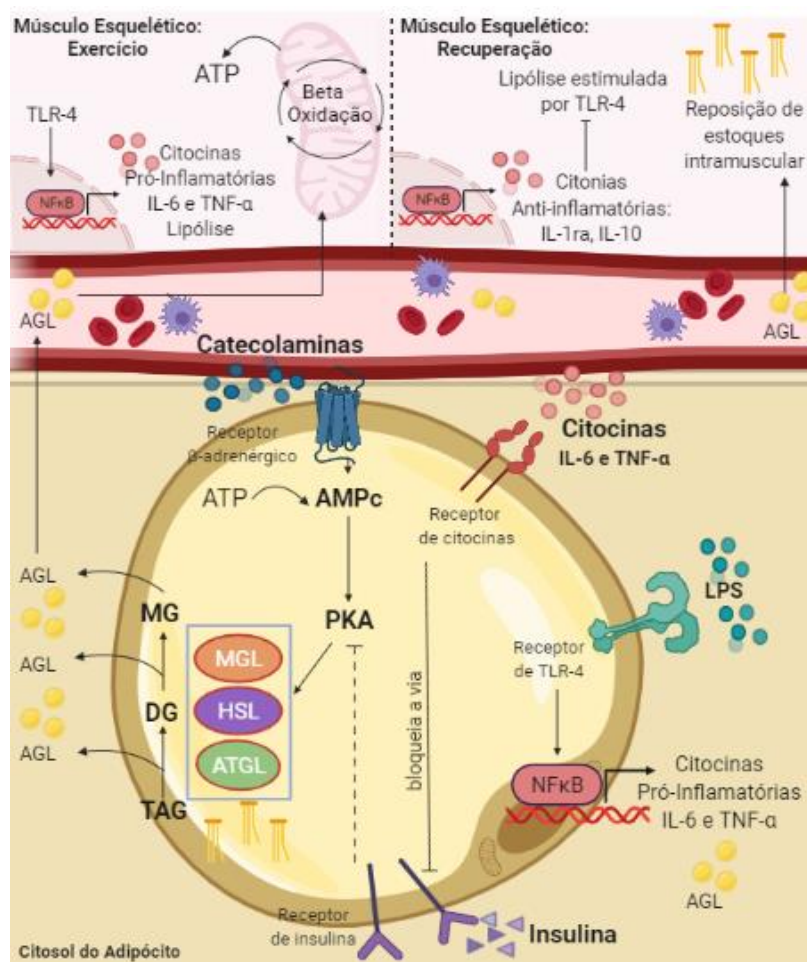


Figura 11. Figura esquemática das diferentes vias com participação na lipólise durante o exercício exaustivo. 1- Inicialmente a ativação clássica dos receptores beta-adrenérgico estimulada pelo aumento das concentrações de catecolaminas durante o exercício culminará na ativação da adenilato ciclase que catalisa a conversão de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclica (AMPc), que serve como um segundo mensageiro para ativar a proteína quinase A (PKA) que consequentemente fosforila HSL e perilipinas. A fosforilação da perilipina pela proteína quinase A permite que o HSL ganhe acesso aos triglicerídeos intracelulares e o estímulo para a lipólise em ácidos graxos (AGL); 2- Além da via clássica, há o aumento na produção citocinas inflamatórias produzidas no músculo esquelético e no tecido adiposo em resposta ao exercício intenso e de longo prazo. Quando

ligadas aos seus receptores, a Interleucina 6 (IL-6) liberada também por monócitos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais, células musculares esqueléticas e dos adipócitos, pode ativar a glicogenólise hepática e a lipólise no tecido adiposo, via ativação da proteína quinase dependente de AMP. Concomitantemente, além de atuar na lipólise, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é capaz de atenuar a sensibilidade à insulina acarretando na inibição das vias de anabolismo no tecido adiposo, uma vez que a lipólise é sensível às mudanças na concentração plasmática de insulina (a maior parte da ação anti-lipolítica da insulina tem sido atribuída ao estímulo da atividade da fosfodiesterase-3 celular, que degrada o AMPc, que reduziria assim a cascata de sinalização responsável pela ativação da lipase hormônio sensível - HSL); 3- Adicionalmente, há o aumento de LPS que será reconhecido pelo TLR-4 presente na superfície celular em conjunto com co-receptores, e regula a produção de citocinas inflamatórias e a ativação do sistema imune inato através da sinalização das vias inflamatórias fator nuclear kappa B (NF- κ B), induzindo também a liberação de mediadores inflamatórios. Portanto, essas três condições promoveriam um aumento na disponibilidade de AGL que serão transportadas pela proteína ligantes de ácidos graxos de adipócitos (FABP), localizadas no citosol da célula adiposa, para a corrente sanguínea onde se ligam à albumina e serão direcionados para outros tecidos. Porém, no período de recuperação, esses estímulos lipolíticos retornam aos seus valores basais e observa-se um aumento na liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-1ra, bem como o redirecionamento dos substratos energéticos para a reposição dos estoques intramusculares depletados. Acetil-CoA= acetilcoenzima A, DG= diacilglicerol, IL-6, MG= monoacilglicerol, MGL= lipase de monoglicerídeos, TAG= triacilglicerol. Ilustração criada no BioRender.

Travassos et al. (2018) reportaram uma correlação entre hiperlactatemia e hipoglicemia com o tempo até exaustão após exercício de natação extenuante. Sabe-se que as mitocôndrias do músculo esquelético podem oxidar o lactato endógeno pela ação da enzima LDH, que facilita a oxidação do lactato para o piruvato (Brooks et al., 1999) utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia de transporte de elétrons. Apesar de não observarmos diferenças significativas nas concentrações de lactato imediatamente após o exercício, as concentrações de glicose se mantiveram constantes. Paralelamente, sugere-se que durante o exercício aeróbico exaustivo, o grupo TLR-4 nocaute intensificou os processos de glicogenólise hepática para que a glicose fosse liberada para a corrente sanguínea a fim de manter as concentrações glicêmicas para manutenção da atividade contrátil da musculatura esquelética e prevenir a hipoglicemia.

Interessantemente, Silveira et al. (2017) demonstrou que camundongos $PPAR\alpha^{-/-}$ também apresentaram melhor desempenho durante o teste de velocidade máxima (5 min de aquecimento com incremento de 3m/minuto até a exaustão) e atingiram maior velocidade máxima média quando comparado com os animais WT.

Uma vez que a sinalização adrenérgica, mediada principalmente por adrenalina, estimula a lipólise no tecido adiposo, a maior disponibilidade de AGL durante o exercício são uma fonte essencial de substrato energético (Stallknecht et al., 2001) e auxilia a conservar as reservas de glicogênio relativamente limitadas da musculatura esquelética. Porém, observamos uma captação significativa e contínua das reservas do conteúdo de TAG intramuscular após o exercício exaustivo no grupo TLR-4. Após o exercício, o aumento da relação de ADP:ATP estimula o metabolismo de substratos mediada por *AMP-activated protein kinase complex $\alpha 2$* (AMPK $\alpha 2$) que cria um aumento na oxidação de ácidos graxos no músculo durante o período de recuperação mediada por piruvato desidrogenase quinase

isoforma 4 (PDK4) para inibição do complexo pyruvate dehydrogenase (PDH) mitocondrial e, consequentemente direcionando a glicose para a síntese de glicogênio (Fritzen et al., 2015). Porém essa resposta aparenta estar prejudicada no grupo TLR-4 e, observado pelo decaimento contínuo do TAG intramuscular, sugerindo uma lipólise contínua nesse grupo até 6h pós-exercício (observada também pelas concentrações elevadas de AGL plasmático até 6h após o exercício).

Similarmente, Frisard et al. (2009) observaram que o estímulo de LPS em camundongos com perda da função TLR-4 apresentaram diminuição da capacidade de oxidação de ácidos graxos como substrato energético sugerindo que, mediada pela endotoxina, o TLR-4 seria um modulador do metabolismo energético. Portanto, os autores propõem que a ativação de TLR-4 resulta na mudança de utilização do substrato no músculo esquelético, favorecendo a glicose como fonte de energia ao invés da oxidação de AGL.

Sabe-se que a ineficiência em metabolizar AG pode levar a uma sobrecarga das concentrações de lipídios circulantes, aumentando a disponibilidade de TAG para serem captados diretamente pelo músculo esquelético e células hepáticas, promovendo acúmulo ectópico anormal (lipotoxicidade) (Guilherme et al, 2008). Estudos sugerem que a ativação do TLR-4 acompanhada pelo aumento de ácidos graxos saturados circulante pode favorecer quadro de desregulação do metabolismo e a ativação do estado pró-inflamatório persistente, como observado na obesidade e resistência à insulina (Shi et al., 2006; Radin et al., 2008).

Em paralelo a isso, a literatura demonstrou que o tecido adiposo subcutâneo (localizado na região abdominal, glútea e femoral) é menos responsivo as ações lipolíticas das catecolaminas e expressam mais receptores α 2-adrenérgicos do que β -adrenérgicos comparado com o tecido adiposo visceral (Lafontan & Berlan, 2003). Essa heterogeneidade da distribuição do tecido adiposo em relação à resposta de catecolaminas poderia alterar a

utilização de AG e glicose pelo músculo esquelético, bem como e a liberação de citocinas.

Deve-se destacar que a ampla disponibilidade de AGL observada no grupo TLR-4 não poderia ser suportada apenas pela lipólise do tecido adiposo (RPAT e MEAT), visto que não observamos aumento nas concentrações de glicerol livre na presença de estímulo externo. A futura verificação da expressão gênica das principais lipases faz-se necessária para justificar a origem desse substrato.

Radin et al (2008) demonstraram que a deleção do TLR-4 no músculo esquelético de camundongos C57BL/6 confere parcial proteção contra resistência à insulina decorrente de infusão de ácido graxo saturado. Um dos mecanismos propostos pelo qual o TLR-4 contribuiria para inflamação, resistência à insulina e obesidade seria pela transcrição de citocinas pró-inflamatórias dependentes em parte da ativação do fator nuclear NF- κ B.

Zbinden-Foncea et al., (2012), após duas sessões de corrida a 70%Vmax por 60 min, separadas por 30 min (protocolo já descrito por aumentar a lipólise), observou que animais WT apresentaram elevação na fosforilação de *mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK), *cJun- NH2-terminal kinase* (JNK) nos músculos tibial anterior e sóleo, mas não em animais TLR-2 e TLR-4 nocautes. Assim, os autores propõem que o TLR seria um mediador na relação do o aumento nas concentrações de AGL e ativação da via p38 MAPK e JNK, uma vez que esse protocolo não induziu alterações na fosforilação de inibidor *kappa B α/β* (I κ B), inibidor da via NF- κ B.

Estudo recente de Lancaster et al., (2018) demonstrou que ácidos graxos de cadeia longa (Palmitato) podem não ser ligantes do receptor de TLR-4, mas a inflamação induzida pelos ácidos graxos é dependente de TLR-4 via sinalização de NF- κ B, JNK e IRF3, principalmente pela incorporação destes ácidos graxos na composição da bicamada lipídica, potencializando a ligação do LPS ao TLR-4. Os autores sugerem ainda que a ativação dessa

via inflamatória resultaria na polarização da via clássica dos macrófagos (pró-inflamatória) dando início a inflamação do tecido adiposo e disfunções metabólicas.

A dinâmica de mobilização e captação de substratos energéticos durante a sessão de exercício físico, principalmente de caráter exaustivo, é fundamental para manutenção da atividade contrátil. Classicamente os hormônios contrarreguladores, como catecolaminas e glicocorticoides, são determinantes para potencializar a mobilização dos estoques de glicogênio hepático e ácidos graxos do tecido adiposo. No entanto, estudos conduzidos pelo Prof. José Cesar Rosa-Neto (2009a; 2009b) evidenciaram a participação também das citocinas como moléculas imunorreguladoras com efeitos sinérgicos ao de hormônios contrarreguladores nos processos de mobilização de substratos energéticos (principalmente no tecido adiposo branco).

Portanto, destaca-se que além das alterações metabólicas, o exercício físico também promove o aumento dos marcadores inflamatórios e citocinas - produzidas e liberadas, principalmente, pelas células do sistema imune (visando o influxo de linfócitos, neutrófilos, monócitos e demais células), pela musculatura ativa, tecido adiposo e algumas células endoteliais - para o foco da inflamação tecidual modulando, dessa forma, a magnitude da resposta inflamatória, uma vez que essas alterações são dependentes das variáveis inerentes ao exercício físico como volume e intensidade (Pedersen, 2009). Essa resposta inflamatória aguda é essencial para a proteção do tecido, remodelamento da matriz extracelular, bem como a angiogênese e adipogênese, facilitando assim o retorno à homeostase e, conseqüentemente, permitindo que a inflamação alcance a resolução ao invés de se tornar crônica (Wernstedt et al., 2014).

Sabe-se que o aumento crônico das concentrações de TNF- α acarreta em perturbações metabólicas e induz a fosforilação de IRS-1 e IRS-2 em resíduos de serina e treonina

causando prejuízo na sinalização da insulina, tanto em adipócitos como em miócitos, diminuição da atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e da translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana (Hotamisligil, 1996; Frisard et al. 2009; Pedersen, 2009). Porém, diferente da inflamação crônica, a ativação sistêmica aguda de TNF- α auxilia na regulação dos processos metabólicos durante o exercício ao induzir a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o núcleo simpático, resultando na elevação das concentrações de cortisol (em humanos) e a corticosterona (em ratos), e catecolaminas no plasma; estimula a disponibilidade de ácidos graxos livres via mecanismo dependente da HSL; modifica o padrão de PERI no tecido adiposo; e estimula a diminuição da expressão da enzima lipase de lipoproteína (LPL) (Cawthorn et al., 2008; Yang et al., 2011).

Ademais, Fried et al. (1998) observaram que a cultura de células de tecido adiposo do depósito visceral produz aproximadamente 3 vezes mais IL-6 do que as culturas do depósito subcutâneo. A IL-6 exerce funções pleiotrópicas no sistema imune, estimulando a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1ra), IL-10 e receptor de TNF solúvel. Classicamente, a IL-10 exerce regulação da transcrição gênica e síntese de citocinas pró-inflamatória, bloqueando um possível estado inflamatório persistente (Wang et al, 1994).

No presente estudo observamos que o grupo TLR-4 nocaute tem o efeito anti-inflamatório do exercício decorrente da liberação de IL-10 alterado, portanto a deleção do TLR-4 aparentemente apresenta prejuízos na síntese e liberação de IL-10 pelo tecido adiposo quando comparado com o grupo WT, sugerindo assim que o TLR-4 pode ter um papel importante na resposta inflamatória decorrente do exercício físico.

Limitações

Os últimos meses têm sido uma resposta a uma crise global sem precedentes, e devido ao Corona Virus Disease (COVID-19) e em apoio aos protocolos de distanciamento físico, o ICB-USP implementou medidas de quarentena, os trabalhos passaram a ser remotos, houve uma transição do ensino presencial para ensino online, e as pesquisas presenciais na instituição foram canceladas.

Apesar de ter ficado fechado na maior parte do ano, no mês de junho/2021 foi realizado um plano de segurança alinhado com as diretrizes de saúde e segurança para reduzir o risco de transmissão COVID-19 e foi permitido o meu retorno à algumas atividades dentro do Laboratório de Imunometabolismo - ICB/USP, seguindo as recomendações que incluem: a) autoavaliar-se diariamente para sintomas de COVID-19; b) ficar em quarentena se estiver doente ou com sintomas por 14 dias; c) distanciamento social e revezamento de acordo com o número de alunos permitidos nas instalações; d) uso de duas máscaras sobrepostas.

Durante esse período foi possível iniciar algumas análises que ainda estão em andamento e análise que, com as restrições de acesso explanadas e dependermos de outros laboratórios auxiliares para a realização das mesmas, deverão ser finalizadas em poucos meses, quais sejam:

- Quantificação da expressão dos genes do tecido adiposo RPAT e MEAT das lipases (ATGL e HSL), PKA, bem como a cascata de sinalização via TLR-4 (TLR-4, MYD88, TRAF-6) pelo protocolo de RT-PCR;

7. CONCLUSÃO

Além disso, para melhor responder nossos objetivos, a linhagem de animais C57BL/6J foi subdividida em dois tratamentos: 1) grupo Propranolol (Sigma Alderich®) - que recebeu 10 mg/kg de peso corporal de Cloridrato de DL-Propranolol, bloqueador beta-adrenérgico pelo método de gavagem 30 minutos antes do protocolo de exercício; e 2) grupo Salina - que recebeu a mesma dosagem de salina (controle), conforme a Figura 4.

8. REFERÊNCIAS

- Al-Majed, A. A., Bakheit, A. H. H., Abdel Aziz, H. A., Alajmi, F. M., & AlRabiah, H. (2017). Propranolol. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2017;42:287-338. doi: 10.1016/bs.podrm.2017.02.006.
- Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz CE. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. Proceedings of the National Academy of Sciences Feb 1999, 96 (3) 1129-1134; DOI: 10.1073/pnas.96.3.1129
- Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. FEBS Lett. 2008 Jan 9; 582(1):117-31.
- Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W. Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). Biol Cell. 1993;77(1):67-76.
- Ferraz EG, Silveira BBB, Sarmiento VA, Santos JN. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. Rev Gaúcha Odontol 2011; 59(3): 483-490.
- Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007 Aug;34(8):760-5.
- Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? Exerc Immunol Rev. 2006;12:6-33.
- Francaux M. Toll-like receptor signalling induced by endurance exercise. Appl Physiol Nutr Metab. 2009 Jun;34(3):454-8. doi: 10.1139/H09-036.
- Freitas AL e Marangon AFC. Consumo Excessivo De Oxigênio Após Atividade Física – Epoc: Uma Breve Explicação. Universitas: Ciências da Saúde. 2004; 2(2):291-306. doi: 10.5102/UCS.V2I2.542
- Frisard MI, McMillan RP, Marchand J, Wahlberg KA, Wu Y, Voelker KA, Heilbronn L,

- Haynie K, Muoio B, Li L, Hulver MW. Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 May;298(5):E988-98. doi: 10.1152/ajpendo.00307.2009. Epub 2010 Feb 23.
- Fritzen AM, Lundsgaard AM, Jeppesen J, Christiansen ML, Biensø R, Dyck JR, Pilegaard H, Kiens B. 5'-AMP activated protein kinase $\alpha 2$ controls substrate metabolism during post-exercise recovery via regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4. *J Physiol.* 2015 Nov 1;593(21):4765-80. doi: 10.1113/JP270821.
- Gleeson M, McFarlin B, Flynn M. Exercise and Toll-like receptors. *Exerc Immunol Rev* 2006; 12: 34-53.
- Goodman JM. Demonstrated and inferred metabolism associated with cytosolic lipid droplets. *J Lipid Res*, 2009; 50: 2148-2456.
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):367-77. doi: 10.1038/nrm2391.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996 Feb 2;271(5249):665-8.
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation* 2006; 13: 816–825.
- Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, et al.: Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res.* 2007;100:1589-1596.
- Lafontan M, Berlan M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Jun;24(6):276-83.
- Lafontan M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab* 2014; 40(1): 16-28.

- Lancaster GI, Langley KG, Berglund NA, Kammoun HL, Reibe S, Estevez E, et al. Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metab.* 2018 May 1;27(5):1096-1110.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.014.
- Lira FS, Rosa JC, Yamashita AS, Seelaender MCL. Endurance training induces depot-specific changes in IL-10/TNF- α ratio in rat adipose tissue. *Cytokine* 2008; 45(2):80-85. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.10.018
- McGarr JA, Oscai LB, Borensztajn J. Effect of exercise on hormone-sensitive lipase activity in rat adipocytes. *Am J Physiol* 1976; 230(2):385-388.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-397.
- Miyoshi H, Souza S, Zhang HH, Strissel K, Christoffolete M, Kovsan J, Rudich A, Kraemer F, Bianco A, Obin M, Greenberg, A. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem* 2006; 281:15837–15844.
- Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JOL, Møller N, Lund S. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endoc* 2014; 52:199–222.
- Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al.: A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 2007;282:35279-35292.
- Olesen J, Biensø RS, Meinertz S, van Hauen L, Rasmussen SM, Gliemann L, Plomgaard P, Pilegaard H. Impact of training status on LPS-induced acute inflammation in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2015 Apr 1;118(7):818-29. doi: 10.1152/jappphysiol.00725.2014. Epub 2014 Dec 30.
- Pedersen, BK, Febbraio, MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1379-406. doi: 10.1152/physrev.90100.2007.

- Radin MS, Sinha S, Bhatt BA, Dedousis N, O'Doherty RM. Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle. *Diabetologia*. 2008 Feb;51(2):336-46. Epub 2007 Dec 1.
- Rosa JC, Lira FS, Eguchi R, Pimentel GD, Venancio DP, Cunha CA, Oyama LM, Mello MT, Seelaender M e Nascimento MOO. Exhaustive exercise increases inflammatory response via Toll like receptor-4 and NF- κ Bp65 pathway in rat adipose tissue. *Prog Lipid Res* 2009a; 48(3-4): 171-190.
- Rosa-Neto JC, Lira FS, Oyama LM, Zanchi NE, Yamashita LS, Batista MLJ, Nascimento CMO, Seelaender M. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol* 2009b; 106: 697–704.
- Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, Kopp A, Schoelmerich J, Falk W. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology* 2009; 126(2): 233-245.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 676-682.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Nov;116(11):3015-25. Epub 2006 Oct 19.
- Stallknecht B, Lorentsen J, Enevoldsen LH, Bülow J, Biering-Sørensen F, Galbo H, Kjaer M. Role of the sympathoadrenergic system in adipose tissue metabolism during exercise in humans. *J Physiol* 2001; 536: 283–294.
- Teixeira AA, Lira FS, Pimentel GD, Oliveira de Souza C, Batatinha H, Biondo LA, Yamashita AS, Junior EA, Neto JC. Aerobic Exercise Modulates the Free Fatty Acids and Inflammatory Response During Obesity and Cancer Cachexia. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2016;26(3):187-98. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016016490. Review.

- Travassos PB, Godoy G, De Souza HM, Curi R, Bazotte RB. Performance during a strenuous swimming session is associated with high blood lactate: pyruvate ratio and hypoglycemia in fasted rats. *Braz J Med Biol Res.* 2018 Mar 26;51(5):e7057. doi: 10.1590/1414-431X20187057.
- Van Handel E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Biochem.* 1965 May;11(2):256-65.
- Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood.* 1994 May 1;83(9):2678-83.
- Yang R, Le G, Li A, Zheng J, Shi Y. Effect of antioxidant capacity on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of rats fed a high-fat diet. *Nutrition* 2006; 22(11-12): 1185-91.
- Zbinden-Foncea H, Deldicque L, Pierre N, Francaux M, Raymackers JM. TLR2 and TLR4 activation induces p38 MAPK-dependent phosphorylation of S6 kinase 1 in C2C12 myotubes. *Cell Biol Int.* 2012;36(12):1107-13. doi: 10.1042/CBI20120081.
- Zhang Z, Schluesener HJ. Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Dec;63(24):2901-7.
- Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Med.* 2008; 38(5):401-23. Review.

9. MATERIAL SUPLEMENTAR

A fim de verificar a hipótese de que a inibição dos receptores beta-adrenérgicos culminaria na maior liberação de citocinas pró-inflamatória e atuaria diretamente no aumento da lipólise do tecido adiposo independente da via clássica, foi realizado o tratamento com bloqueadores beta-adrenérgicos não seletivos (β_1 e β_2) não específico - grupo Propranolol - que têm como mecanismo a inibição por competição desses receptores exercendo efeitos no sistema cardiovascular, inibindo as respostas cronotrópicas (ritmo cardíaco), inotrópicas (débito cardíaco) e vasoconstritoras das catecolaminas bem como diminuição da glicogenólise e neoglicogênese.

Tabela 2. Parâmetros de composição corporal e de desempenho no exercício exaustivo do grupo Propranolol.

Variáveis	Wild Type Salina
Peso corporal (g)	23,45 $\pm$ 0,30
Índice de adiposidade (%)	1,78 $\pm$ 0,05 ^b
Subcutâneo (g)	0,155 $\pm$ 0,006
Retroperitoneal (g)	0,038 $\pm$ 0,001
Epididimal (g)	0,221 $\pm$ 0,007
Mesentérico (g)	0,093 $\pm$ 0,006
V _{máx} (m/min)	24,76 $\pm$ 0,67 ^b
Distância total (m)	821,00 $\pm$ 19,83 ^b
Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. V _{máx} = velocidade máxima. Teste ANOVA One-way com nível de significância de p<0,05. b= diferença	

significativa do grupo TLR-4 KO.

Resultados

A Figura 12 apresenta as dosagens referentes ao perfil metabólico do grupo Propranolol. Foi observada diferenças significativas na glicose sérica entre os grupos Propranolol e TLR-4 2h pós-exercício (Propranolol: 135.1 ± 8.2 ; TLR-4: 174.22 ± 10.6 mg/dL, $p=0.007$, $\eta^2=0.126$). Houve efeito para o momento de mensuração no grupo Propranolol ($p=0.025$; $\eta^2=0.135$), sendo que 2h e 6h pós-exercício apresentaram perda ponderal e níveis menores do que imediatamente pós-exercício (0h: 165.46 ± 0.42 ; 6h: 134.20 ± 0.34 mg/dL).

Observou-se ainda que o grupo Propranolol apresentou menor concentração de lactato do que os grupos WT Salina e TLR-4 KO no momento basal (Salina: 4.33 ± 0.41 ; Propranolol: 2.56 ± 0.34 ; TLR: 5.41 ± 0.00 mmol/L, $p=0.031$, $\eta^2=0.156$), bem como diferenças significativas para os momentos 0h e 6h (de 4.62 ± 0.42 para 3.99 ± 0.35 mmol/L respectivamente, $p=0.038$, $\eta^2=0.166$).

O grupo Propranolol apresentou menores concentrações de TAG 6h pós-exercício quando comparado com a condição basal, 0h e 2h ($p=0.0001$, $\eta^2=0.165$), além disso foi significativamente diferente do grupo TLR-4 no momento 6h pós-exercício ($p=0.039$, $\eta^2=0.148$).

Quando avaliado a enzima lactato desidrogenase, foi observado efeito do tempo apenas no grupo Propranolol, com queda no momento 6h quando comparado com o basal e 0h (basal: 920.03 ± 87.27 , 0h: 949.63 ± 87.27 , 6h: 525.92 ± 87.27 U/L, $p=0.035$; $\eta^2=0.188$).

Adicionalmente, o grupo Propranolol apresentou valores menores (71%) de

glicogênio muscular que o grupo Salina (Salina: 2.81 ± 0.15 ; Propranolol: 2.01 ± 0.17 ; TLR-4: 2.17 ± 0.21 mg/g de tecido, $p=0.043$; $\eta^2=0,186$) indicando uma maior mobilização de glicogênio muscular desse grupo.

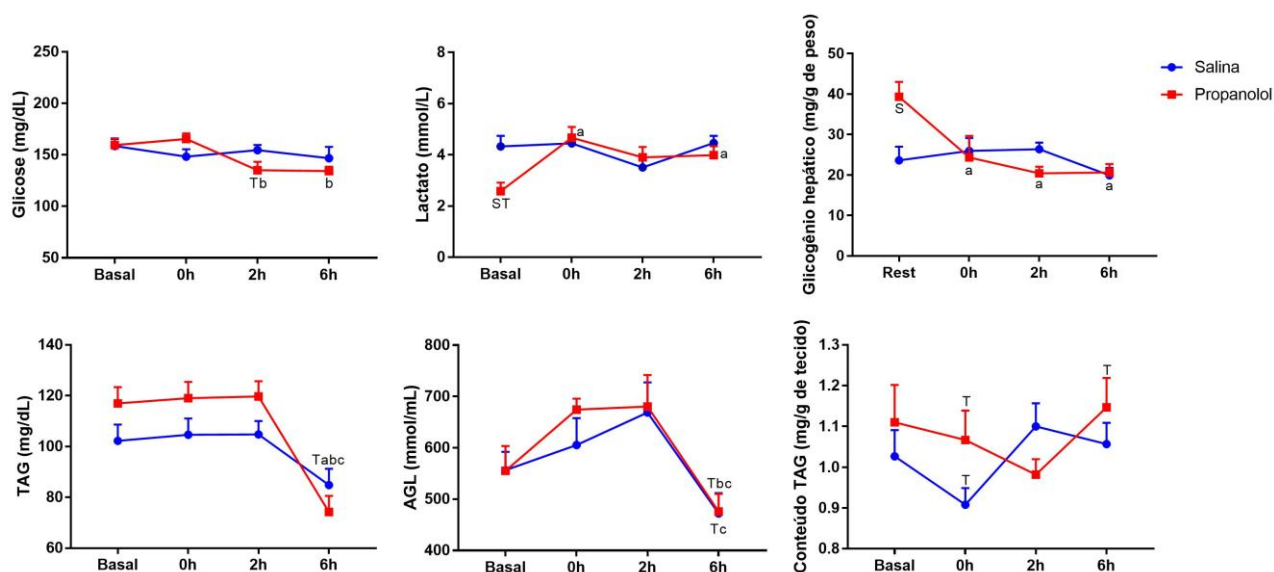


Figura 12. Concentrações sanguíneas de lactato, glicose, triacilglicerol, ácidos graxos livres, glicogênio hepático e conteúdo de TAG intramuscular de animais Wild Type tratados ou não com beta-bloqueador adrenérgico (10mg/kg de peso de Propranolol) após exercício exaustivo agudo.

Referente ao perfil inflamatório, observou-se elevações nas concentrações de TNF- α imediatamente pós-exercício no grupo Propranolol ($p=0.038$; $\eta^2=0.128$) quando comparado com o repouso (147.13 ± 38.86 pg/ μ g de proteína) e os demais time-point.

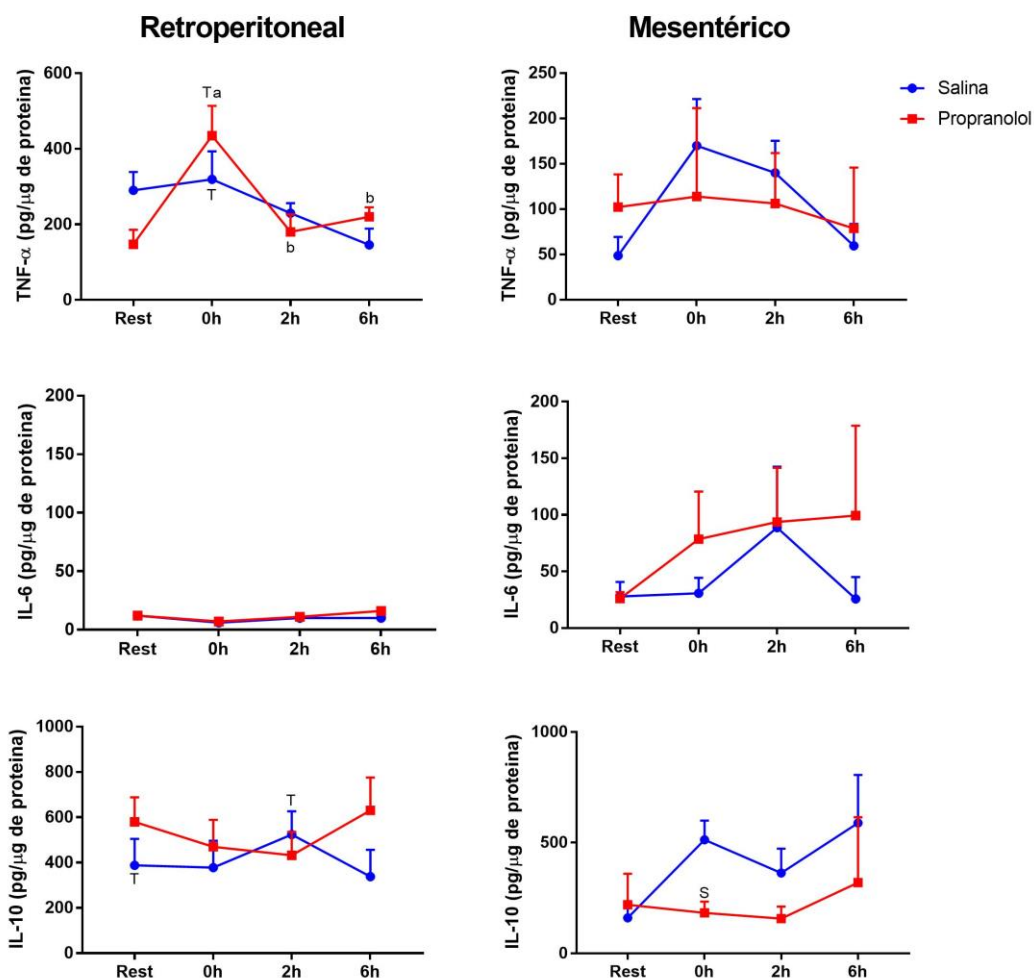


Figura 13. Concentrações de citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 de animais Wild Type tratados ou não com beta-bloqueador adrenérgico (10mg/kg de peso de Propranolol) após exercício exaustivo agudo.

Conclusão

Na presente tese, buscamos elucidar o processo de lipólise durante sessão de exercício aeróbio. Para melhor rastreamento deste processo, adotamos o tratamento farmacológico nos animais selvagens com intuito de bloquear a resposta adrenérgica. Sabe-se que o propranolol inibe a resposta simpática dos estímulos adrenérgicos bloqueando competitivamente os

receptores β -adrenérgicos no miocárdio e no músculo liso brônquico e vascular - acarretando na diminuição da frequência cardíaca, contratilidade miocárdica e débito cardíaco, bem como aumenta o tempo de ejeção sistólica e o volume cardíaco (Al-Majed et al, 2017).

Foi hipotetizado que o betabloqueio com propranolol reduziria a demanda metabólica obrigando o animal a realizar alterações compensatórias, como uma maior produção e liberação de citocinas, porém esse fato só foi observado nas concentrações de TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal imediatamente após o exercício (grupo Propranolol).

Devido às nossas limitações na reprodução deste animal em biotério, não foi possível coletar amostras do grupo TLR-4 nocaute com tratamento agudo de Propranolol a fim de verificar e comparar as respostas inflamatórias.