



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Victor Faria Motta

Treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT em esteira) tem efeitos benéficos em camundongos alimentados com dieta rica em frutose

Rio de Janeiro
2018

Victor Faria Motta

Treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT, em esteira) tem efeitos benéficos em camundongos alimentados com dieta rica em frutose

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M921 Motta, Victor Faria.

Treinamento intervalado de alta intensidade (HITT, em esteira) tem efeitos benéficos em camundongos alimentados com dieta rica em frutose / Victor Faria Motta – 2018.

79 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarin de Lacerda

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Frutose - Teses. 2. Dietas induzidas pela nutrição – Teses. 3. Tecido adiposo branco – Teses. 4. Termogênese - Teses. I. Lacerda, Carlos Alberto Mandarin. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 613.72:616-056.52

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Victor Faria Motta

Treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT, em esteira) tem efeitos benéficos em camundongos alimentados com dieta rica em frutose

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 7 de março de 2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim de Lacerda (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes -UERJ

Prof^a Dra. Marcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Luiz Eduardo de Macedo Cardoso
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Pedro Paulo da Silva Soares
Universidade Federal Fluminense

Prof^a Dra. Thereza Cristina Lonzetti Bargut
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

À minha família e a minha mulher, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos Alberto Paula Motta e Heloisa Faria Motta, pela vida e pelo amor incondicional. Obrigado por acreditarem em mim e por estarem sempre ao meu lado guiando meus passos. Vocês são motivo de inspiração na busca dos meus sonhos. Meu amor e gratidão por vocês serão eternos...

A minha irmã, Gabriela, o presente mais lindo que meus pais me deu. Obrigado pela sua doce presença em minha vida, meu porto seguro, você está em tudo e é parte de mim...

À minha namorada, mulher, companheira, cúmplice Cláudia Moraes Mansano e as minhas pequenas, Ana Clara Mansano e Luísa Mansano, por todos os momentos de paciência e compreensão, para que este trabalho pudesse ser escrito com calma e presteza. Amo muito vocês!!!

A Dra. Cyrila Zaltman, médica responsável pela orientação no meu tratamento médico. Mais uma vez, agradeço por toda ajuda até agora. Meu muito obrigado!

Amigos são presentes que escolhemos para nossa vida: Thaís Ceciliano, Thatiany Marinho e Franciele Graus. Obrigado por estarem sempre ao lado!!!

Aos Profs. Afonso Henriques Bandeira Muniz de Aragão e Marco Aurélio Rodrigues da Fonseca Passos, pelo pontapé inicial e introdução ao mundo da pesquisa científica. Com vocês, aprendi tudo que sei em questão a Anatomia Humana, com o meu período na monitoria da Educação Física.

À Aline Penna e Michele Soares pelo apoio técnico no trabalho. Sem vocês, nada disso poderia ter sido realizado.

À Profa. Dr^a Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda, pela atenção e presteza com o meu trabalho e, por toda a assessoria nos aspectos nutricionais deste projeto. Meu muito obrigado!

Ao Prof. e orientador Dr. Carlos Alberto Mandarin-de Lacerda. Pela confiança durante o período de mais um trabalho. Agradeço a cada dia a possibilidade de pertencer a um laboratório de renome, onde pude desenvolver meu trabalho com todo suporte técnico e também, crescer como pessoa e profissional. Espero que possamos continuar o desenvolvimento de novos projetos. Meu muitíssimo obrigado!

Aos demais colegas e professores do LMMC/BHex, Celina Borges, Luana Camelo, Priscila Carapeto, Helder Gonçalves, Filipe Gabriel, Wilian Lannes, Flávia Veiga, Raquel, etc... a lista é bem grande! Obrigado pelo cuidado e atenção que tiveram comigo.

Até cortar os próprios defeitos pode ser perigoso. Nunca se sabe qual é o defeito que sustenta o nosso edifício inteiro.

Clarice Lispector

RESUMO

MOTTA, Victor Faria. *Treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT, em esteira) tem efeitos benéficos em camundongos alimentados com dieta rica em frutose*. 2018. 79 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Os adoçantes calóricos ricos em frutose induzem alterações adversas no metabolismo dos seres humanos. O estudo avaliou os efeitos do treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) em um modelo de alimentação rico em frutose, com foco no fígado, tecido adiposo branco epididimário e subcutâneo (TABe e TABs), músculo esquelético e suas interações. Camundongos C57BL/6 machos foram alimentados durante 18 semanas uma das seguintes dietas: controle (C;) ou frutose (F). Na 10^a semana, durante um período adicional de 8 semanas, os grupos foram divididos em grupos não-treinados (NT) ou HIIT, totalizando quatro grupos: C-NT, C-HIIT, F-NT e F-HIIT. No final do experimento, o consumo de frutose no grupo F-NT levou a uma elevada pressão arterial sistólica, triglicérides plasmáticos elevados, resistência à insulina com intolerância à glicose e menor sensibilidade à insulina. Também observamos esteatose hepática, hipertrofia de adipócitos e expressões genéticas diminuídas de PGC1 α e da FNDC5/Irisin) no grupo F-NT. Estes resultados foram acompanhados por diminuição do NRF 1 e do TFAM (biogênese mitocondrial) e do PPAR α e do CPT1 (β -oxidação). O HIIT melhorou todos esses dados nos grupos C-HIIT e F-HIIT. O grupo F-NT mostrou uma redução no gasto calórico associada à diminuição da expressão de genes envolvidos no *browning* do TABs. Os grupos HIIT em comparação com os grupos NT mostraram uma diminuição no ganho de MC, queda na massa de TABs, associada a um aumento no gasto de energia. Nos grupos HIIT em comparação com os grupos NT, a expressão de marcadores de *browning* foi elevada, juntamente com genes envolvidos na biogênese mitocondrial e na β -oxidação. Em conclusão, camundongos alimentados com uma dieta rica em frutose, HIIT melhorou a MC, PAS, metabolismo da glicose e triglicérides plasmáticos. HIIT estimulou o *browning* do TABs, em associação com alterações benéficas na mitocondrial biogênese e marcadores de β -oxidação). Os órgão-alvo foram modulados positivamente pelo HIIT, indicando-o como um tratamento adjuvante para doenças que afetam estes tecidos.

Palavras-chave: Frutose. HIIT. Fígado. Tecido adiposo branco. Músculo esquelético.

Browning. Termogênese.

ABSTRACT

MOTTA, Victor Faria. *High-intensity interval training (HIIT, treadmill) has beneficial effects in mice fed a high-fructose diet*. 79 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

High-fructose caloric sweeteners induce adverse changes in the metabolism of humans. The study evaluated the effects of high-intensity interval training (HIIT) on a fructose rich diet model, focusing on liver, epididymal and subcutaneous white adipose tissue (eWAT and sWAT), skeletal muscle and their interactions. Male C57BL/6 mice were fed for 18 weeks one of the following diets: control (C;) or fructose (F). In the 10th week, for an additional 8 weeks, the groups were divided into untrained groups (NT) or HIIT, totalling four groups: C-NT, C-HIIT, F-NT and F-HIIT. At the end of the experiment, the consumption of fructose in the F-NT group led to high systolic blood pressure (SBP), elevated plasma triglycerides, insulin resistance with glucose intolerance and decreased insulin sensitivity. We also observed hepatic steatosis, adipocyte hypertrophy and decreased genetic expressions of PGC1 α and FNDC5/Irisin in the F-NT group. These results were accompanied by a decrease in NRF1 and TFAM (mitochondrial biogenesis) and PPAR α and CPT1 (β -oxidation). HIIT improved these data in the C-HIIT and F-HIIT groups. The F-NT group showed a reduction in caloric expenditure associated with decreased genes expression involved in sWAT browning. The HIIT groups compared to NT groups showed a decrease in BM gain, decrease in sWAT mass, associated with an increase in energy expenditure. In HIIT groups compared to NT groups, expression of browning markers was high along with genes involved in mitochondrial biogenesis and β -oxidation. In conclusion, mice fed a high fructose diet, HIIT improved BM, SBP, glucose metabolism and plasma triglycerides. HIIT stimulated browning of sWAT, in association with beneficial changes in mitochondrial biogenesis and β -oxidation. The target organs were positively modulated by HIIT, indicating it as an adjuvant treatment for diseases that affect these tissues.

Keywords: Fructose. HIIT. Liver. White adipose tissue. Skeletal muscle. Browning. Thermogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Frutose em órgãos-alvo e Síndrome metabólica.....	16
Figura 2 -	Frutose, Glicose e Metabolismo.....	17
Figura 3 -	Diferenças morfológicas entre os tipos de tecido adiposo.....	21
Figura 4 -	Metabolismo da frutose no fígado e suas vias de atuação.....	23
Figura 5 -	Evolução da massa corporal.....	39
Figura 6 -	Evolução da pressão arterial sistólica (PAS).....	40
Figura 7 -	TOTG: Evolução da glicemia.....	41
Figura 8 -	Triglicérides hepático e densidade de volume de esteatose hepática.....	43
Figura 9 -	Dispersão da área transversa média de adipócitos.....	44
Figura 10 -	Expressões gênicas de PGC1alfa, PGC1beta e FNDC5.....	46
Figura 11 -	Expressões gênicas de NRF1 e TFAM.....	48
Figura 12 -	Expressões gênicas de PPARalfa e CPT1.....	50
Figura 13 -	Marcadores de “Browning” no tecido adiposo subcutâneo.....	56
Figura 14 -	Fotomicrografias do tecido adiposo subcutâneo: H&E e Confocal.....	57
Figura 15 -	Marcadores de biogênese mitocondrial no TAB subcutâneo.....	58
Figura 16 -	Marcadores de beta-oxidação no TAB subcutâneo.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e conteúdo energético das dietas experimentais.....	30
Tabela 2 - <i>Primers</i> para RT-qPCR e respectivas sequências.....	36
Tabela 3 - Ingestão alimentar e metabolismo de carboidrato.....	38
Tabela 4 - <i>ANOVA</i> de dois fatores: Frutose vs. HIIT.....	52
Tabela 5 - Biometria e gasto energético.....	53
Tabela 6 - <i>ANOVA</i> de dois fatores: Frutose vs. HIIT.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – adenosina trifosfato
CD137 - cluster de diferenciação 137
CPT1a - carnitine palmitoyltransferase 1a
DHGNA – doença hepática gordurosa não alcoólica
DUhTP - Dummerstorf marathon mouse model
DM2 – diabetes mellitus do tipo 2
FGF21 - fibroblast growth factor 21
FNDC5 - Fibronectin type III domain-containing protein 5
GLUT2 – glucose Transporter 2
GLUT5 – glucose Transporter 5
HIIT – high-intensity interval training
IVC - índice de volume corporal
MC – massa corporal
NRF1 - nuclear respiratory factor 1
NT – não treinado
PAS – pressão arterial sistólica
PGC1alfa - peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PGC1beta - peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta
PPARalfa - peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPARgama - peroxisome proliferator-activated receptor beta
PRDM16 - PR domain containing 16
QUICKI - quantitative insulin sensitivity check index
RNA – ácido ribonucleico
SVF - stromal vascular fraction
TAB – tecido adiposo branco
TABs – tecido adiposo branco subcutâneo
TAM – tecido adiposo marrom
TBP – tata box protein
TFAM - mitochondrial transcription factor A
TOTG – teste oral de tolerância à glicose
UCP1 – uncoupling protein 1
VO₂ – volume de oxigênio

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1	Frutose	15
1.2	Tecido Adiposo	18
1.2.1	<u>Tecido Adiposo Branco</u>	18
1.2.2	<u>Tecido Adiposo Marrom</u>	19
1.2.3	<u>Tecido Adiposo Bege</u>	19
1.3	Esteatose Hepática Não Alcoólica	21
1.4	Treinamento intervalado de Alta Intensidade	23
2	HIPÓTESE	25
3	OBJETIVO	26
3.1	Objetivo principal	26
3.2	Objetivo específico	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Animais	27
4.2	Dietas e Treinamento físico	27
4.3	Ingestão alimentar, massa corporal e TOTG	29
4.4	Pressão arterial sistólica (PAS)	29
4.5	Sacrifício dos animais	29
4.6	Análises plasmáticas	30
4.7	Fígado	31
4.8	Área transversa média do adipócito	31
4.9	RT-Qpcr	32
4.10	Western Blotting	33
4.11	Microscopia confocal de varredura a laser e microscopia óptica	34
4.12	Análise estatística	34
5	RESULTADOS	37

5.1	Subprojeto 1	37
5.1.1	<u>Ingestão alimentar e massa corporal</u>	37
5.1.2	<u>Pressão arterial sistólica</u>	37
5.1.3	<u>Teste oral de tolerância à glicose</u>	37
5.1.4	<u>Análises plasmáticas</u>	41
5.1.5	<u>Fígado</u>	42
5.1.6	<u>Área transversa média do adipócito</u>	43
5.1.7	<u>Expressão gênica de PGC-1alfa, PGC-1beta e FNDC5</u>	45
5.1.8	<u>Biogênese mitocondrial</u>	47
5.1.9	<u>Beta-oxidação</u>	49
5.1.10	<u>ANOVA de dois fatores</u>	51
5.2	Subprojeto 2	53
5.2.1	<u>Ganho de massa corporal e gasto energético</u>	53
5.2.2	<u>Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs)</u>	54
5.2.3	<u>Browning</u>	54
5.2.4	<u>Biogênese mitocondrial do TABs</u>	55
5.2.5	<u>Beta-oxidação do TABs</u>	59
5.2.6	<u>ANOVA de dois fatores</u>	59
6	DISCUSSÃO	61
6.1	Subprojeto 1	61
6.2	Subprojeto 2	64
	CONCLUSÃO GERAL	66
	REFERÊNCIAS	67
	APENDICE - Artigo aceito.....	77
	ANEXO A - Artigo submetido.....	78
	ANEXO B - Aprovação pelo Comitê de Ética.....	79

INTRODUÇÃO

O consumo exagerado de dietas rica em açúcares simples é precursor da manifestação de condições clínicas da obesidade, do diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), da resistência à insulina (RI), da hipertensão arterial e da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (1-3).

A epidemiologia mostra um aumento significativo no consumo diário de açúcares (450 a 600kcal/pessoa) ao redor do mundo. O mesmo acontece com o consumo excessivo de gorduras. Atualmente, no mundo, são 650 milhões de pessoas obesas. A escassez de tempo e a falta do envolvimento com a atividade física concluem um ciclo nocivo com o aumento dos fatores de risco (4).

A literatura tem de uma forma completa descrito os efeitos de um consumo excessivo e contínuo de dietas ricas em gordura sobre as valências físicas do indivíduo e suas tentativas de minimizar suas consequências (5-7). Mas, atualmente, novos estudos estão aparecendo para a tentativa de investigação dos efeitos da utilização dos açúcares simples como a frutose, sacarose e outros, como possíveis “vilões” da saúde do indivíduo (8, 9).

A Frutose é um monossacarídeo encontrado em abundância nas frutas, e é utilizado de uma forma comercial e industrial como açúcar adicionado em bebidas adoçadas, sucos, refrigerantes, etc, e também sob a forma de xarope de milho rico em frutose. Seu poder de adoçar e o baixíssimo custo de produção favorece sua utilização em larga escala (10). As pesquisas mais atuais vêm mostrando que a frutose, de alguma forma, é mais nociva a pequeno, médio e longo prazo para o desenvolvimento de morbidades como inflamação sistêmica, dislipidemia, RI, DHGNA, hipertensão artéria, etc (2, 8, 11, 12).

Em função destes estudos, pesquisadores cada vez mais estão interessados em investigar mais a fundo as conexões deste macronutriente com o metabolismo. Porém, as conclusões achadas nestes estudos ainda são controversas (13).

Para uma tentativa de amenização deste efeitos adversos providos pela frutose, o treinamento físico mostrou efeitos benéficos nas alterações adversas em roedores, como aumento da pressão arterial e alterações no perfil de estresse oxidativo (14), o que impediu alterações na sinalização de insulina, síntese de óxido nítrico (15) e inflamação (16). Do mesmo modo, caminhar foi eficiente na diminuição da secreção de insulina pós-prandial em humanos que consomem uma dieta rica em frutose (17). Nas adversidades induzidas pela frutose, os efeitos benéficos do treinamento físico foram observados quando o treinamento de

intensidade baixa (15) ou moderada (14) foi aplicado, mas pouco se sabe sobre as consequências do treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT, períodos de exercícios de alta intensidade combinados com pequenos intervalos de descanso). O HIIT é cada dia mais considerado como uma possível substituição do exercício aeróbico tradicional (18), devido à diminuição do tempo necessário para a atividade e à combinação de estímulos aeróbicos e anaeróbicos (19). Embora a maioria dos estudos tenha se concentrado nos efeitos cardiovasculares do exercício (14, 15), o fígado, o tecido adiposo branco (TAB) e a musculatura esquelética também são objetivos naturais de treinamento físico (16, 20). TAB e músculo esquelético têm uma relação biológica que ocorre de forma endócrina através da secreção de adipocinas (TAB) e miocinas (músculo). Os mediadores comuns que são liberados por ambos os tecidos, chamados de adipomiocinas, tiveram um significado aumentado na literatura (21), incluindo a Irisina (derivada da clivagem de FNDC5, aumentando o gasto de energia) (22). Recentemente, a expressão de RNAm do FNDC5 foi identificada no fígado (23), e as concentrações séricas de irisina foram encontradas inversamente correlacionadas com o acúmulo de lipídios hepáticos (24). Portanto, é digno de nota que esses mediadores, incluindo a irisina, podem ser modulados tanto pela obesidade como pelo exercício (21).

Além da função de armazenamento de energia, o tecido adiposo branco (TAB) também é considerado um tecido secretor metabolicamente ativo (25). O *browning* é caracterizado pela formação de depósitos de células adiposas bege (ou 'brite') no tecido adiposo subcutâneo (TABs) (26), o que confere um fenótipo semelhante ao do tecido adiposo marrom (TAM), induzindo aumento da termogênese (27)[3]. Assim, em condições basais, essas células apresentam baixo teor de proteína de desacoplamento (UCP)1 mas, expressam quantidades aumentadas de PRDM16 e UCP1 e aumento do conteúdo mitocondrial quando estimuladas (28, 29). Por isso, podemos considerar um alvo promissor para o tratamento futuro da obesidade ou do diabetes tipo 2, a estimulação da atividade do TAM e o recrutamento de células positivas para UCP1 (30).

Levando os dados em consideração, estamos encorajados a investigar os efeitos do HIIT em um modelo experimental com o consumo crônico de uma dieta rica em frutose. Nós temos a hipótese que o HIIT poderia beneficiar o fígado, o TAB (epididimário), o músculo esquelético contra os efeitos adversos induzidos pela frutose e que o HIIT poderia favorecer a formação dos adipócitos beges (fenômeno do *browning*) no tecido adiposo subcutâneo (TABs).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Frutose

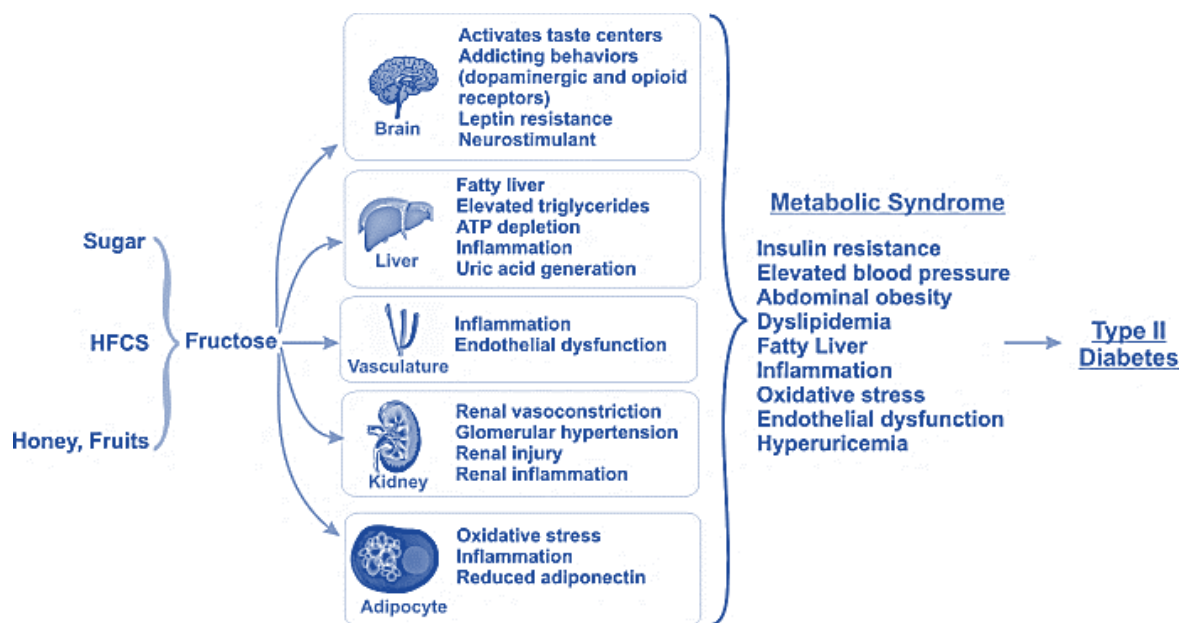
É um monossacarídeo também conhecido como levulose, ou açúcar que está nas frutas e é constituinte da sacarose e de outros polímeros (10). Ela pode ser obtida a partir do sorbitol e essa reação é catalisada pela enzima sorbitol-desidrogenase, presente nas plantas e outras fontes, como balas, gomas de mascar, sucos dietéticos, refrigerantes, etc (10). Sob um ponto de vista comercial, é muito vantajoso a utilização da frutose: maior poder edulcorante de todos os tipos de açúcar, poder umectante, traz vantagens na questão de cor, aroma, ponto de congelamento e estabilidade osmótica (31). Este açúcar também pode ser encontrado na forma de xarope de milho rico em frutose, este cada vez mais utilizado na confecção de frutas enlatadas, geleias, doces, pó para bebidas e refrigerantes. Este xarope é quase 2 vezes mais doce do que a sacarose e, sua utilização é mais viável por conta do baixíssimo custo de seu processamento (13, 31).

O xarope de milho rico em frutose é um adoçante feito a partir da isomerização de parte da glicose existente no xarope de milho. Com isso, podemos ter xaropes com diversos percentuais de frutose no comércio. O principal deles é o xarope de milho 90 (90% de frutose e 9% de glicose) e, este é diluído 42 (42% de frutose e 53% de glicose) e 55 (55% de frutose e 42% de glicose). O xarope de milho 55 é o mais utilizado nas indústrias para a confecção de refrigerantes, iogurtes, pães, etc (32). Assim, a utilização da frutose e/ou do xarope de milho nos produtos comerciais trouxe uma série de questionamentos com respeito a saúde e despertou na comunidade científica o interesse de se estudar seus efeitos em tecidos e órgãos-alvo (33).

A prevalência da síndrome metabólica aumentou em todo o mundo, e esse aumento tem sido associado ao aumento da ingestão de xarope de milho (34). A Síndrome metabólica, um conjunto de condições, incluindo aumento da pressão arterial, níveis elevados de glicose no sangue, excesso de gordura corporal e níveis de colesterol anormais, o que aumenta o risco de doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e diabetes (35). Uma dieta rica em frutose (60% de frutose) em roedores também tem causado distúrbios metabólicos, incluindo pressão arterial elevada, intolerância à glicose e hiperlipidemia, bem como uma desregulação do sistema renina-angiotensina (SRA) (36).

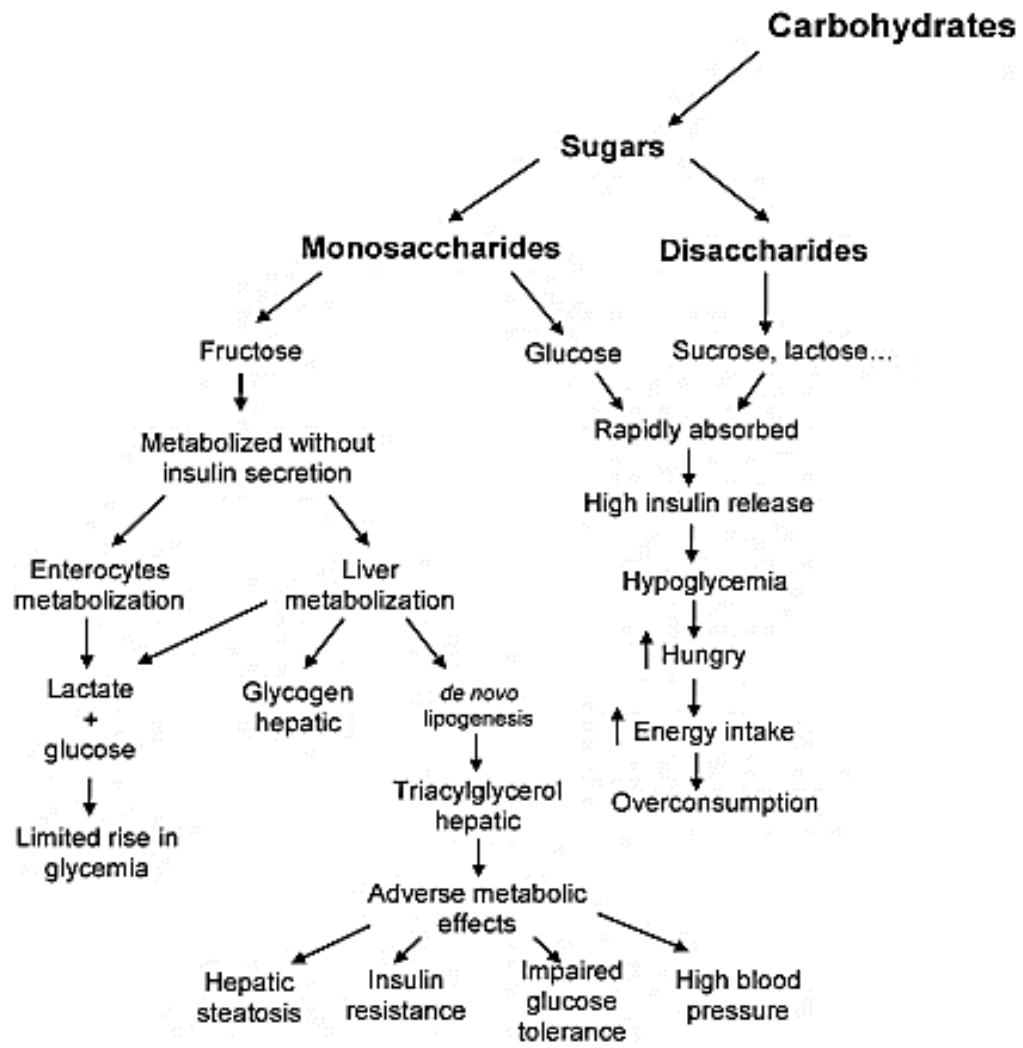
Os modelos em animais experimentais alimentados com dieta rica em frutose são comumente utilizados para a investigação da hipertensão arterial e distúrbios. Estudos recentes também observaram esses fenômenos em roedores hipertensos alimentados com frutose (2, 11). No entanto, embora os estudos tenham demonstrado que a resistência à insulina desempenha um papel na mediação da síndrome metabólica, a patogênese desses distúrbios metabólicos ainda não foi amplamente explicada.

Figura 1 - Efeitos da frutose em órgãos-alvo e na Síndrome Metabólica



Legenda: Adaptado de (33).

Figura 2 - Frutose, Glicose e Metabolismo



Legenda: Adaptado de (37).

1.2 Tecido adiposo

O tecido adiposo é um tecido conjuntivo composto principalmente de adipócitos. Além dos adipócitos, o tecido adiposo contém a fração vascular estromal (SVF) de células, incluindo preadipócitos, fibroblastos, células endoteliais vasculares e uma variedade de células imunes, como macrófagos (38). O tecido adiposo é derivado de preadipócitos. Seu principal papel é armazenar energia na forma de lipídios, embora também ajude no preenchimento corporal. Longe de ser hormonalmente inerte, o tecido adiposo, nos últimos anos, foi reconhecido como um órgão endócrino, pois produz hormônios como leptina, estrogênio, resistina e TNFalfa (39). Os dois tipos de tecido adiposo são o tecido adiposo branco (TAB), que armazena energia em forma de lipídio e tecido adiposo marrom (TAM), responsável por gerar calor (40). Mais recentemente se descreveu a presença de um tipo de adipócito com características de TAB e função de TAM; o chamado adipócito “bege” (ou *brite*, em inglês) (41).

1.2.1 Tecido adiposo branco (TAB)

Nos seres humanos, o tecido adiposo está localizado abaixo da pele (gordura subcutânea), em torno de órgãos internos (gordura visceral), na medula óssea, intermuscular (sistema muscular) e no tecido mamário. O tecido adiposo é encontrado em locais específicos, que são referidos como depósitos adiposos. O tecido adiposo contém numerosos vasos sanguíneos pequenos. No sistema tegumentar, que inclui a pele, acumula-se no nível mais profundo, a camada subcutânea, proporcionando isolamento do calor e do frio (42). Ao redor dos órgãos, ele fornece um preenchimento protetor. No entanto, sua principal função é ser uma reserva de lipídios, que podem ser oxidados para atender às necessidades energéticas do corpo e protegê-lo do excesso de glicose, armazenando triglicérides produzidos pelo fígado a partir de açúcares, embora algumas evidências sugeriram que a maior parte da síntese lipídica de carboidratos ocorre no próprio tecido adiposo (43).

A gordura visceral ou gordura abdominal está localizada dentro da cavidade abdominal entre os órgãos. A gordura visceral no camundongo tem vários depósitos adiposos, incluindo o tecido adiposo branco epididimário (TABe) e depósitos perirrenais. O excesso de gordura visceral é conhecido como obesidade central. Novos índices como o Índice de Volume Corporal (IVC) são projetados especificamente para medir o volume abdominal e a

gordura abdominal. O excesso de gordura visceral tem associação com o DM2 (44), resistência à insulina, doenças inflamatórias e outras doenças relacionadas à obesidade (45).

A maioria da gordura não-visceral restante é encontrada logo abaixo da pele em uma região chamada hipoderme (46). Esta gordura subcutânea não está relacionada a muitas das patologias clássicas relacionadas à obesidade (como doenças cardíacas, câncer e acidentes vasculares cerebrais), mas sugere-se que ela pode ser protetora (46).

1.2.2 Tecido adiposo marrom (TAM)

O TAM é encontrado em quase todos os mamíferos. A classificação da gordura marrom refere-se a duas populações de células distintas com funções semelhantes. O primeiro compartilha uma origem embriológica comum com células musculares, encontradas em depósitos "clássicos" maiores. O segundo se desenvolve a partir de adipócitos brancos que são estimulados pelo sistema nervoso simpático. Estes adipócitos são encontrados intercalados em tecido adiposo branco e também são chamados de "bege" (26, 47, 48).

O TAM é especialmente abundante em recém-nascidos e em mamíferos que hibernam (49). Também está presente e metabolicamente ativo em humanos adultos (50, 51), mas sua prevalência diminui à medida que os seres humanos envelhecem (52). Sua principal função é a termorregulação. Além do calor produzido pelo tremor do músculo, o tecido adiposo marrom produz calor por termogênese sem tremor.

Em contraste com os adipócitos brancos, que contêm uma única gota de lipídios, os adipócitos marrons contêm numerosas gotículas pequenas de gordura e um número elevado de mitocôndrias (que dá ao tecido sua aparência marrom) (47). O TAM também contém mais capilares do que o TAB, que serve para fornecer mais oxigênio e nutrientes ao TAM e distribuir o calor produzido para todo o corpo.

1.2.3 Tecido adiposo bege

A transformação "bege" ocorre quando adipócitos dentro de depósitos de TAB desenvolvem características de TAM. Os adipócitos bege assumem uma aparência

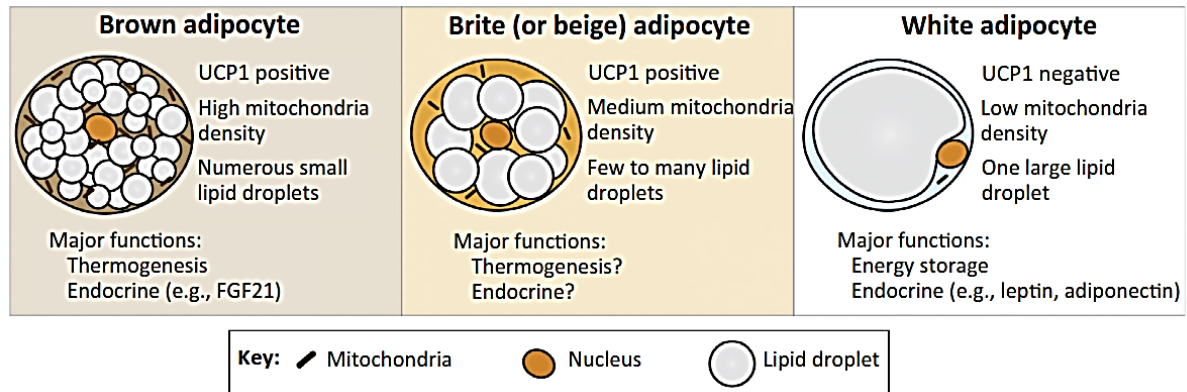
multilocular (contendo várias gotículas lipídicas) e aumentam a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) (29). Ao fazê-lo, esses adipócitos normalmente armazenam energia e se tornam adipócitos liberadores de energia.

A UCP1 é uma proteína predominantemente encontrada no TAM (53). A liberação de catecolaminas de nervos simpáticos resulta em ativação de UCP1 e geralmente ocorre após longos períodos de exposição ao frio ou em resposta à hiperalimentação (53). A atividade de UCP1 é estimulada por ácidos graxos de cadeia longa que são produzidos após a ativação do receptor beta-adrenérgico (40). A capacidade de queima de calorias de TAM e adipócitos “bege” tem sido mais estudada no conjunto de esforços de pesquisa em terapias direcionadas para tratar obesidade e diabetes (30).

O frio é um regulador primário dos processos do TAM e um indutor de *browning* do TAB. O *browning*, em resposta a exposição crônica ao frio, é um processo reversível. Um estudo em ratos demonstrou que este processo induzido pelo frio pode ser completamente revertido em 21 dias, com diminuições mensuráveis na expressão de UCP1 observadas dentro de um período de 24 horas (54). Em animais reexpostos a um ambiente frio, os mesmos adipócitos adotam um fenótipo bege, sugerindo que os adipócitos bege são retidos na reversão do *browning* (55).

Três reguladores da transcrição são fundamentais para o processo de *browning* do TAB e servem como alvos para muitas das moléculas que influenciam este processo. Estes incluem o receptor de PPAR γ , PRDM16 e PGC-1 α (55). A lista de moléculas conhecidas que influenciam o *browning* cresceu em proporção direta à popularidade deste tópico e está em constante evolução à medida que mais conhecimento é adquirido. Entre estas moléculas está a FNDC5/Irisina, que hoje é bem estudada e se acredita ser um importante regulador do *browning*. A irisina é secretada pelo músculo esquelético em resposta ao exercício e aumenta de expressão na formação de preadipócitos bege (27). FGF21, um hormônio secretado principalmente pelo fígado, foi identificado como um potente estimulador na absorção de glicose e um regulador de *browning* através de seus efeitos no PGC-1 α (29). O FGF21 também pode ser segregado em resposta ao exercício e a dieta de baixa proteína (41, 56). Os dados desses estudos sugerem que fatores ambientais como a dieta e o exercício físico podem ser importantes mediadores do *browning*.

Figura 3 - Diferenças morfológicas entre os três tipos de adipócitos



Legenda: Adaptado de (57).

1.3 Esteatose hepática não alcoólica

A doença gordurosa não alcoólica do fígado (DHGNA) é uma desordem caracterizada pelo excesso de acúmulo de gordura na forma de triglicérides nos hepatócitos, referida como esteatose hepática. Essa condição, na presença de outras morbidades, pode provocar lesões e morte celular, inflamação portal e lobular, “balonização” dos hepatócitos, levando à esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) (58, 59). Com a progressiva deposição de colágeno e subsequente remodelação vascular, um processo cirrótico pode acontecer e tornar-se uma causa importante de uma insuficiência hepática (60).

A DHGNA geralmente está associada com outras entidades e desordens metabólicas, como obesidade, DM2, resistência insulínica, dentre outras (60). Vale lembrar que a DHGNA é atualmente a causa mais comum de alterações enzimáticas nos países ocidentais, sendo a maior prevalência no DM2 (40 a 80%) e obesidade (30 a 90%) (61).

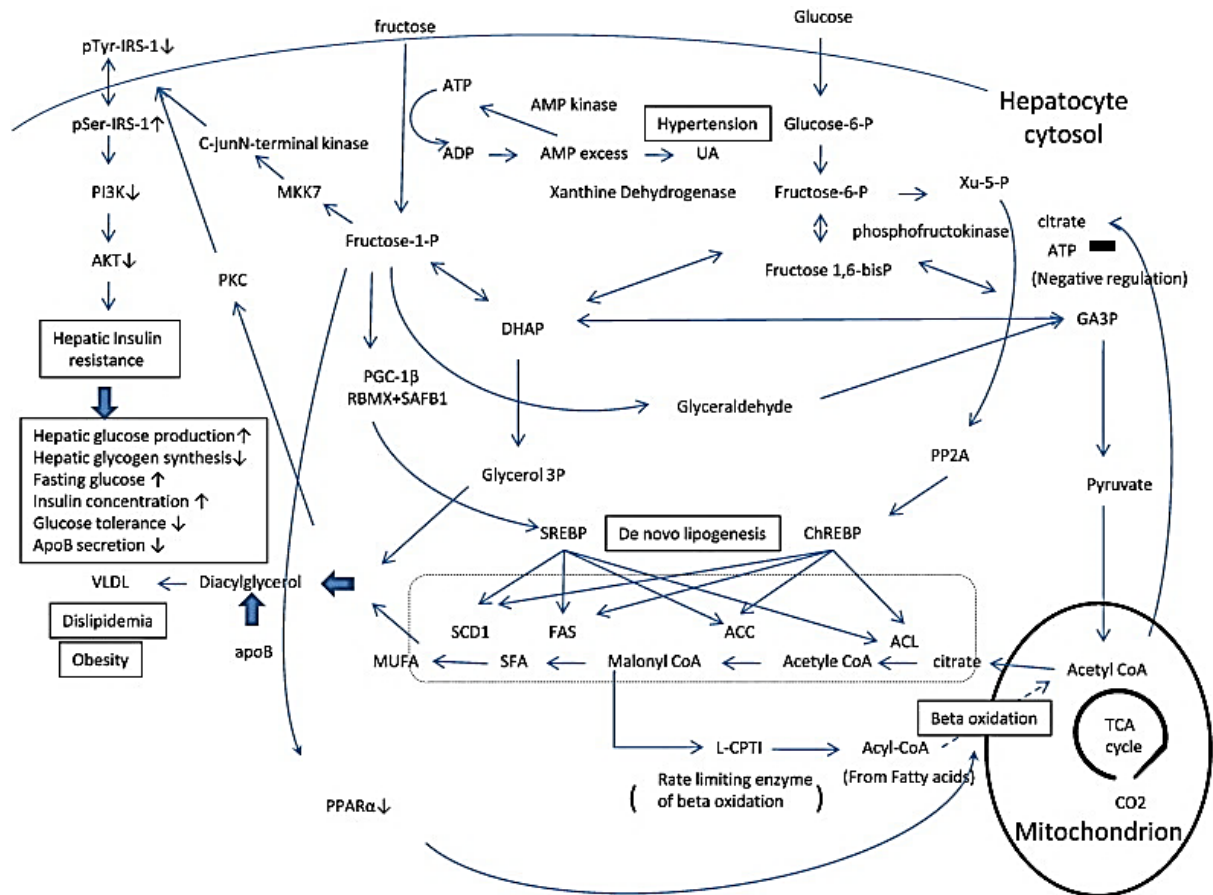
O acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos promove a síntese de triglicérides. O fígado pode contribuir de uma forma própria para a esteatose hepática pela produção de lipídios a partir de carboidratos, processo este chamado de lipogênese *de novo*. Este excesso acaba desencadeando uma disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, ativação de células estreladas hepáticas, comprometimento na produção de ATP e consequente morte celular. A ativação das células estreladas hepáticas leva a uma maior produção de colágeno e fibrose hepática, estágio inicial da cirrose hepática (62).

A frutose é capturada pelo enterócito via GLUT5 e este processo acontece independentemente da insulina e da hidrólise de ATP. Parte da frutose é transformada em lactato e, após, segue para os vasos sanguíneos via GLUT2, pela membrana basolateral do enterócito, chegando ao fígado através da veia porta hepática e, a partir da frutoquinase, é fosforilada em frutose-1P (63). Um outro derivado fosforilado da frutose é responsável por seu metabolismo: a frutose-2,6-difosfato, que está presente em todos os tecidos dos mamíferos, sendo o mais potente efetor da fosfofrutoquinase. Ela desempenha um papel na regulação da glicólise e no controle da gliconeogênese nas células que possuem esta habilidade (64).

A frutose desabilita a oxidação de lipídios no fígado, favorecendo a formação de triglicérides e VLDL. Mesmo sendo uma pequena porção de frutose convertida em ácidos graxos, a ingestão continuada de frutose pode levar ao desenvolvimento da DHGNA. A associação da frutose com a dislipidemia e a DHGNA se deve ao aumento da lipogênese *de novo*. Todos estes fatores agrupados direcionam à estocagem de gordura nos hepatócitos na forma de macro e microvesículas (65).

Os efeitos da administração crônica de uma dieta rica em frutose e o aparecimento de DHGNA não são conclusivos. Dose-resposta, tempo de administração, e veículo de oferta da frutose divergem entre os estudos experimentais (66). Camundongos da linhagem C57BL/6 alimentados com dieta rica em frutose mostraram a presença de esteatose hepática macro e micro vesicular, demonstrando ser um bom modelo para o desenvolvimento de DHGNA/EHNA (2, 11).

Figura 4 - Metabolismo da frutose no fígado e suas vias de atuação



Legenda: Adaptado de (67).

1.4 Treinamento intervalado de alta intensidade

O treinamento intervalado de alta intensidade (ou HIIT, do inglês “high-intensity interval training”) pode ser descrito como uma sessão de exercícios composta inteiramente de técnicas HIIT, ou como componente de um plano fracionado de exercícios. As sessões de HIIT geralmente consistem em um período de aquecimento e, em seguida, várias repetições de exercícios de alta intensidade separados por exercício de moderada/baixa intensidade para recuperação. O exercício de alta intensidade deve ser feito com uma intensidade quase máxima. O exercício de moderada/baixa deve ser por volta de 30% de intensidade. O número de repetições vai depender do tipo de exercício, mas por exemplo, podem ser apenas três repetições com 20 segundos de exercício intenso (68). Os exercícios específicos realizados

durante as sessões de alta intensidade variam. A maior parte da pesquisa sobre o HIIT foi feita usando um ergômetro de ciclismo, mas outros exercícios como corrida, escalada e caminhada podem também ser utilizados (69).

Não existe uma fórmula específica para o HIIT. Uma fórmula comum envolve uma proporção 2:1 de trabalho para períodos de recuperação, por exemplo, 30-40 segundos de corrida em alta intensidade alternada com 15-20 segundos de *jogging* ou caminhada, repetidamente até a fadiga completa. Uma sessão de HIIT pode durar entre quatro e trinta minutos, o que significa que pode ser considerada uma excelente maneira de maximizar um treino limitado pelo tempo (68).

HIIT e treinamento de resistência tradicional levaram a uma melhora cardiovascular em adultos saudáveis de 18 a 45 anos, com mais melhorias no VO_{2max} nos participantes do HIIT (70). Outra análise relatou que HIIT de um mês ou mais efetivamente melhora a aptidão cardiovascular em adolescentes e levam a melhorias significativas na composição corporal (71). Além disso, HIIT (definido como quatro intervalos de quatro minutos a 85-95% da frequência cardíaca máxima com intervalos de três minutos a 60-70% da frequência cardíaca máxima) foi mais eficaz do que o treinamento contínuo de intensidade moderada (MICT) para a melhora da função vascular (72).

Em pessoas com doença arterial coronariana, HIIT levou a significativas melhorias no VO_{2max} , mas MICT levou a uma maior redução na massa corporal e na frequência cardíaca (73). A aptidão cardiorrespiratória (medida pelo VO_{2max} de indivíduos com doenças cardiovasculares ou metabólicas crônicas induzidas pelo estilo de vida, incluindo pressão alta, obesidade, insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana ou síndrome metabólica) no HIIT foi quase o dobro dos indivíduos que completaram um programa de MICT (74).

O HIIT reduziu significativamente a resistência à insulina, levando a uma diminuição moderada dos níveis de glicemia em jejum e aumento da perda de massa corporal em comparação com indivíduos sedentários (75). Outro estudo relatou que HIIT foi mais eficaz do que MICT nos níveis de insulina em jejum (diminuição de 31% no HIIT vs. diminuição de 9% no MICT) (76).

O efeito do HIIT sobre o desempenho cognitivo num grupo de crianças (n=318) mostrou que HIIT é benéfico para o controle cognitivo e capacidade de memória de trabalho e que esse efeito é mediado pelo polimorfismo do fator neurotrófico derivado do cérebro, o que sugere uma alternativa promissora para melhorar a cognição, através de sessões de exercícios curtos e potentes (77).

2 HIPÓTESE

Temos a hipótese que o HIIT terá um efeito benéfico relevante no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo em animais com um insulto metabólico grave devido a ingestão crônica de dieta com alto teor de frutose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Investigar os efeitos do HIIT (em esteira) em camundongos alimentados com dieta rica em frutose frente aos efeitos deletérios resultantes em órgãos-alvo: fígado, tecido adiposo branco (epididimário e subcutâneo) e músculo esquelético.

3.2 Objetivos específicos

- a) **Subprojeto 1**, avaliar as alterações promovidas pelo HIIT na expressão de FNDC5/Irisina e PGC1alfa, na biogênese mitocondrial e na beta-oxidação no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético;
- b) **Subprojeto 2**, avaliar as alterações promovidas pelo HIIT na formação de adipócitos “beges” (fenômeno de *browning*) no tecido adiposo branco subcutâneo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os procedimentos seguiram as diretrizes em voga para experimentação animal (publicação NIH número 85-23, revisado em 1996) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocolo nº CEUA/012/2014, Anexo).

Foram estudados 40 camundongos C57BL/6 machos não consanguíneos com três meses de idade, com massa corporal de 20-22 g. Os animais foram mantidos em ambiente estável (estantes ventiladas Nexgen System, Allentown, PA, EUA) com temperatura controlada e ciclo de luz claro-escuro invertido de 12-12 h, cinco animais por caixa em “cama” de Xilana. Os animais tiveram livre acesso a alimentos e água.

4.2 Dietas experimentais e treinamento físico

As dietas foram confeccionadas pela Pragsolucoes (Jau, São Paulo, Brasil) seguindo recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN 93) para roedores (78) e estão detalhadas na Tabela 1.

As dietas foram oferecidas aos animais durante 18 semanas. Os animais foram alocados aleatoriamente nos grupos (n=20/grupo): dieta de controle (C) e dieta rica em frutose (F).

A dieta C teve 5% da energia total a partir da sacarose, enquanto a dieta F teve uma adição de frutose (474,3g/kg de dieta), totalizando 55% da energia total a partir da frutose. Nas oito semanas finais do experimento (da semana 10 à semana 18), os camundongos foram submetidos ao protocolo HIIT e os grupos foram subdivididos (n=10/grupo):

- a) dieta controle, não-treinado (grupo C-NT);

- b) dieta controle, treinados (grupo C-HIIT);
- c) dieta rica em frutose, não-treinado (grupo F-NT);
- d) dieta rica em frutose, treinado (grupo F-HIIT).

A adaptação da terminologia utilizada para monitorar e promover a atividade física e o exercício num modelo animal é um desafio (79). Observamos um esquema de codificação que classifica o exercício físico específico pela taxa de gasto de energia, especificando atividades com a sua intensidade, definida como a proporção da taxa metabólica do trabalho para um metabolismo de repouso padrão (80).

No presente estudo os animais realizaram um teste de VO_{2max} e um teste de velocidade máxima de corrida para se estimar a porcentagem de intensidade (Oxylet, Panlab/Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha). Portanto, para os animais, consideramos HIIT como o seguinte protocolo:

- a) Teste consistindo em corrida (10 cm/s de aumento de velocidade a cada 2 min sem inclinação) onde mediu-se o VO_{2max} quando os animais atingiram e sustentaram a velocidade máxima de corrida. O teste foi encerrado quando o animal parou de responder ao estímulo de corrida e se recusou a correr na esteira (modelo LE8710, Panlab/Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha);
- b) Nas primeiras quatro semanas de treinamento, os animais foram submetidos a uma porcentagem de 80% do VO_{2max} , conforme estipulado nos testes preliminares. No início da quinta semana, o VO_{2max} foi aferido novamente e, nas últimas quatro semanas de treinamento, os animais foram submetidos uma porcentagem de 90% do VO_{2max} . Utilizamos um esquema de proporção 2:1 (2 min de exercício por 1 min de recuperação ativa);
- c) Os animais realizaram o treinamento três vezes por semana, 12 minutos por sessão (começando às 14h), nas segundas, quartas e sextas feira, durante oito semanas.

4.3 Ingestão alimentar, massa corporal e teste oral de tolerância à glicose

Mensuramos a ingestão alimentar diariamente, a massa corporal (MC) semanalmente, e o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) (n=10/grupo).

O TOTG foi realizado no dia seguinte a última sessão HIIT. Cada animal recebeu 1 g/kg de glicose a 25% dissolvida em uma solução salina fisiológica - NaCl a 0,9% - no tempo 0 (gavagem orogástrica). Em seguida, a glicemia foi mensurada aos 15, 30, 60 e 120 minutos (glicômetro AccuCheck, Roche, SP, Brasil) estabelecendo-se curvas glicêmicas e a área sob as curvas (AUC) foram analisadas (GraphPad Prism versão 7.03 para Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4.4 Pressão arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida semanalmente em animais sem anestesia (pletismografia de artéria caudal, Letica LE 5001, Harvard/Panlab, Barcelona, Espanha). Os animais (n=10/grupo) foram previamente treinados durante duas semanas para minimizar o estresse durante o manuseio que poderia interferir com a aferição.

4.5 Sacrifício dos animais

Os animais foram submetidos a um jejum de seis horas antes do sacrifício para mensurarmos a glicemia (glicômetro Accu-Check, Roche, SP, Brasil). Após, foram anestesiados profundamente com pentobarbital sódico por via intraperitoneal (150 mg / kg). Em seguida colheu-se amostras de sangue e o plasma foi separado por centrifugação (120G durante 15 minutos à temperatura ambiente) e armazenado a -80°C.

O fígado, tecido adiposo epididimário (dissecado na parte inferior do abdome e conectado ao epidídimo) e músculo esquelético (gastrocnêmio direito) foram dissecados rapidamente e retirados. Vários fragmentos de cada órgão foram congelados e armazenados a

-80°C para análises posteriores, ou mantidos em fixador (recentemente preparado formaldeído 4% peso/volume, tampão fosfato 0,1 M pH 7,2) para microscopia de luz.

O tecido adiposo branco subcutâneo localizado na parte inferior da caixa torácica foi cuidadosamente dissecado, pesado e congelado a -80°C para análises adicionais. Algumas partes deste tecido foram mantidas em fixador recém-preparado (formaldeído 4% peso/volume, tampão fosfato 0,1 M pH 7,2) para microscopia de luz.

Tabela 1 - Composição e conteúdo energético das dietas experimentais (78)

Ingredientes (g/Kg)	Controle	Frutose
Caseína	140,0	140,0
Amido de milho	620,692	146,392
Sacarose	100,0	100,0
Frutose	-	474,3
Óleo de soja	40,0	40,0
Fibras	50,0	50,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Cisteína	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidantes	0,008	0,008
Total	1000	1000
Carboidratos (% energia)	76	76
Proteína (% energia)	14	14
Lípidios (% energia)	10	10
Total energético (kcal/kg)	3804	3804

4.6 Análises plasmáticas

Os triglicérides totais foram mensurados (TG, espectrofotômetro automático e kit comercial Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG), bem como os níveis de insulina (Single Plex kit, EZRMI-13K rat/mouse insulin ELISA, Millipore Merck, Darmstadt, Germany) (n=10/grupo para cada análise). Também determinamos:

- a) o índice de avaliação do modelo de homeostase - resistência à insulina (HOMA-IR) $[(\text{insulina} \times \text{glicose}) / 22,5]$ (81);

- b) o índice quantitativo de verificação da sensibilidade à insulina (QUICKI) [1 / log (insulina em jejum $\mu\text{U} / \text{ml}$) + log (glicemia de jejum em mg/dl)] (82).

4.7 Fígado

Os triglicérides hepáticos foram mensurados. As amostras congeladas de fígado (~50mg) em 1 ml de isopropanol foram colocadas em um processador ultrassônico. O homogenato foi centrifugado a 120 G e 5 ml do sobrenadante foram analisados por um analisador automático (83) (K55, Bioclin System II, Quibasa) usando um kit para quantificação de triglicérides (n=5/grupo).

Fragmentos representativos de cada lobo hepático foram incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e seções de 5 μm de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina (n=5/grupo). Imagens digitais foram adquiridas de forma cega e aleatória (Nikon modelo 80i, câmera digital DS-Ri1, Nikon Instruments, Melville, Nova Iorque, EUA). A estimativa de esteatose hepática foi determinada por estereologia com o método de “contagem de pontos”. Sistemas-teste com 36 pontos foram produzidos com o programa STEPanizer (84) e sobrepostos às imagens digitais. Os pontos amostrados sobre as gotículas de gordura (da esteatose) (P_p) foram relacionados aos “pontos totais” (P_T) do sistema levando a estimativa da densidade de volume (V_v) da esteatose hepática nos hepatócitos (85, 86):

$$V_v[\text{esteatose, hepatócito}] = \frac{P_p}{P_T} \quad (1)$$

4.8 Área transversa média do adipócito

Os fragmentos de tecido adiposo epididimário foram incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foram cortados com 5 μm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (n=10/grupo). Imagens digitais foram obtidas de modo “cego” e aleatório (Nikon modelo 80i, câmera digital DS-Ri1, Nikon Instruments) e, em cinco cortes

por animal, foram utilizadas para estimar a área transversa média do adipócito ($\bar{a}[\text{adipócitios}]$):

$$\bar{a}[\text{adipócitios}] = \frac{V_v[\text{adipócitios}]}{Q_A[\text{adipócitios}]} \mu\text{m}^2 \quad (2)$$

[sendo a densidade de volume dos adipócitos, $V_v[\text{adipócitios}]$ e o dobro da densidade numérica por área de adipócitos, $Q_A[\text{adipócitios}]$, considerando o critério de “linha-proibida” (87)]

4.9 RT-qPCR

Extraímos o RNA total com TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) em 30 mg de tecido hepático, tecido adiposo epididimário e músculo gastrocnêmio (quantificado com espectrofotômetro Nanovue, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA) (n=6/grupo, para os três tecidos e todos os *primers* usados).

Então, 1 μg de RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen). O cDNA de primeira cadeia foi sintetizado usando *primers* Oligo (dT) para RNAm e transcriptase reversa Superscript III (ambos Invitrogen). O PCR quantitativo em tempo real foi realizado usando um termociclador CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e SYBRGreen mix (Invitrogen). Após um programa de pré-desnaturação e ativação de polimerase (4 min a 95°C), 44 ciclos de 95°C por 10s e 60°C por 15s foram seguidos por um programa de curva de derretimento (60 a 95°C com uma taxa de aquecimento de 0,1°C/s). Os controles negativos consistiram em poços nos quais o cDNA era substituído por água desionizada.

A razão de expressão relativa do RNAm foi calculada usando a equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, na qual $-\Delta C_t$ representa a diferença entre o número de ciclos dos genes alvo (CT) e o controle endógeno. Os *primers* estão detalhados na Tabela 2 e sua definição seguiu a “Informação Mínima para Publicação de diretrizes Quantitativas de Experimentos de PCR em Tempo Real” (88). Avaliamos a expressão gênica dos seguintes marcadores:

- a) ativador ativado por proliferador de peroxisoma ativado por ativação do receptor 1 (PGC1) -alfa;
- b) ativador ativado por proliferador de peroxisoma ativador gama 1 (PGC1) -beta;

- c) domínio de fibronectina tipo III contendo 5 (FNDC5);
- d) fator respiratório nuclear 1 (NRF1);
- e) fator de transcrição mitocondrial A (TFAM);
- f) receptor ativado por proliferador de peroxisoma (PPAR)-alfa;
- g) carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1).

Padronizamos a expressão destes genes selecionados com as expressões endógenas de beta-actina e proteína TATA-box (TBP).

Para o tecido adiposo subcutâneo, foram usados os respectivos *primers* para a avaliação gênica dos seguintes marcadores:

- a) cluster de diferenciação 137 (CD137);
- b) carnitina palmitoiltransferase 1a (CPT1a);
- c) fibronectina tipo III domínio 5 (FNDC5);
- d) fator respiratório nuclear (NRF) 1;
- e) receptor de ativador ativado por proliferador de peroxisoma (PGC1)-alfa;
- f) proliferador de peroxisoma receptor alpha ativado (PPARalfa);
- g) PPARgama; domínio PR contendo 16 (PRDM16);
- h) fator de transcrição mitocondrial (TFAM);
- i) proteína de desacoplamento (UCP) 1.

Padronizamos a expressão destes genes selecionados com as expressões endógenas de beta-actina.

4.10 Western blotting

As proteínas totais foram extraídas do tecido adiposo subcutâneo usando tampão de lise e inibidores de protease. As quantidades equivalentes de proteína total, ressuspensas em tampão contendo SDS, foram aquecidas durante 5 min a 100°C e separadas por SDS-PAGE. Após a eletroforese, as proteínas foram identificadas em uma corrida com gradiente elétrico em membranas de transferência de difluoreto de polivinilo (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). O bloqueio da membrana foi feito com leite desnatado. As membranas foram incubadas durante a noite à 4°C com os anticorpos primários:

- a) CD137 (60 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-11819);
- b) PRDM16 (140 kDa; Abcam, ab-106410);
- c) UCP1 (33 kDa; Santa Cruz Biotechnology, sc-6529).

A beta-actina (43 kDa, Santa Cruz, sc-47778) foi utilizada para padronização dos dados. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário durante uma hora à temperatura ambiente. Utilizamos ECL para a detecção de expressão proteica no equipamento ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade de quimiluminescência das bandas foi quantificada usando o programa ImageJ, versão 1.48 (NIH, imagej.nih.gov/ij, EUA).

4.11 Microscopia de luz e confocal por varredura à laser

Os tecidos foram incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), e os blocos foram cortados com 5 µm de espessura. Para microscopia óptica, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina, e as fotomicrografias digitais foram obtidas com um microscópio Olympus BX51 e uma câmera DP71 (Olympus Co. Americas, Center Valley, PA, EUA). Para a imunofluorescência de UCP1, as seções de tecido adiposo subcutâneo foram colocadas em um tampão de citrato, pH 6,0, a 60°C durante 20 min para recuperação de antígenos, 2% de glicina e bloqueador (PBS / 5% de BSA). As seções de tecido adiposo subcutâneo foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo anti-UCP1 (SC-6529, Santa Cruz Biotechnology), diluídas 1:50 em PBS / 1% BSA, seguido por uma hora de incubação com IgG-Alexa 546 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) diluído 1:50 em PBS/1% de BSA. Após a lavagem em PBS, as lâminas foram montadas com Slow Fade Antifade (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). As imagens digitais foram feitas por um microscópio confocal de varredura a laser (Nikon Model C2, Nikon Instruments, Inc., Nova York, EUA).

4.12 Análise estatística

Os dados foram testados para a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e igualdade de variância (teste de Brown-Forsythe) e depois relatados como média e desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram testadas com a análise de variância de um fator

(ANOVA) e o pós-teste de Holm-Sidak. Além disso, analisamos os efeitos da dieta e do HIIT como fatores independentes e as possíveis interações entre eles com a ANOVA de dois fatores (GraphPad Prism versão 7.03 para Windows, San Diego, Califórnia, EUA) e foi considerado estatisticamente significativo um valor de $P < 0,05$.

Tabela 2 - Primers para RT-qPCR e respectivas sequências

Genes	(5'- 3')	Primers
beta-actina	FW	TGTTACCAACTGGGACGACA
	RV	GGGGTGTGTAAGGTCTCAA
CPT-1a	FW	GCAGAGCACGGCAAATGA
	RV	GGCTTTCGACCCGAGAAGAC
CD137	FW	CCCACATATTCAAGCAACCA
	RV	GCTCATAGCCTCCTCCTCCT
FNDC5	FW	GGTGCTGATCATTGTTGTGG
	RV	CGCTCTTGGTTTTCTCCTTG
NRF1	FW	GTTGGTACAGGGGCAACAGT
	RV	GTAACGTGGCCCAGTTTTGT
PGC-1alfa	FW	AACCACACCCACAGGATCAGA
	RV	TCTTCGCTTTATTGCTCCATGA
PGC-1beta	FW	CCATGGCAGAAGAGGTGAGA
	RV	TTTCACCTCCAGCCTCAGAG
PPARalfa	FW	CAAGGCCTCAGGGTACCACTAC
	RV	GCCGAATAGTTCGCCGAAA
PPARgama	FW	AACTCCCTCATGGCCATTGA
	RV	CCTTGCATCCTTCACAAGCA
PRDM16	FW	AGGGCAAGAACCATTACACG
	RV	GGAGGGTTTTGTCTTGTTCA
TBP	FW	CAGCCTTCCACCTTATGCTC
	RV	TTGCTGCTGTCGTCTTTGTT
TFAM	FW	GAAGAACGCATGGAGGAGAG
	RV	TTCTGGGGAGAGTTGCAGTT
UCP1	FW	TCTCAGCCGGCTTAATGACT
	RV	TGCATTCTGACCTTCACGAC

Legenda: CPT1, Carnitina Palmitoiltransferase 1; FNDC5, Fibronectina de tipo III contendo 5; NRF1, fator respiratório nuclear 1; PGC-1alfa, receptor de ativação ativada por proliferador de Peroxisoma 1alfa; PPARalfa, receptor alfa ativado por proliferador de peroxisoma; TBP, proteína de ligação TATA; TFAM, fator de transcrição mitocondrial A.

5 RESULTADOS

5.1 Subprojeto 1

Alterações promovidas pelo HIIT na expressão de FNDC5/Irisina e PGC1alfa, na biogênese mitocondrial e na beta-oxidação no fígado, tecido adiposo e músculo esquelético;

5.1.1 Ingestão alimentar e massa corporal

A ingestão alimentar não foi diferente entre os grupos ao longo do experimento (Tabela 3). Nas primeiras 10 semanas (antes do HIIT), a MC não foi diferente. Após o HIIT, a MC foi 12% menor no grupo C-HIIT em comparação com o grupo C-NT ($P < 0,001$) e 7% menor no grupo F-HIIT em comparação com o grupo F-NT ($P = 0,001$) (Fig. 5).

5.1.2 Pressão arterial sistólica

Após as primeiras 10 semanas da dieta, a PAS elevou-se 4% no grupo F-NT em comparação ao grupo C-NT ($P = 0,0017$). Após o HIIT, a PAS diminuiu 6% no C-HIIT em comparação com o grupo C-NT ($P < 0,001$) e diminuiu 9% no grupo F-HIIT em comparação com o grupo F-NT ($P < 0,001$) (Fig. 6).

5.1.3 Teste oral de tolerância à glicose

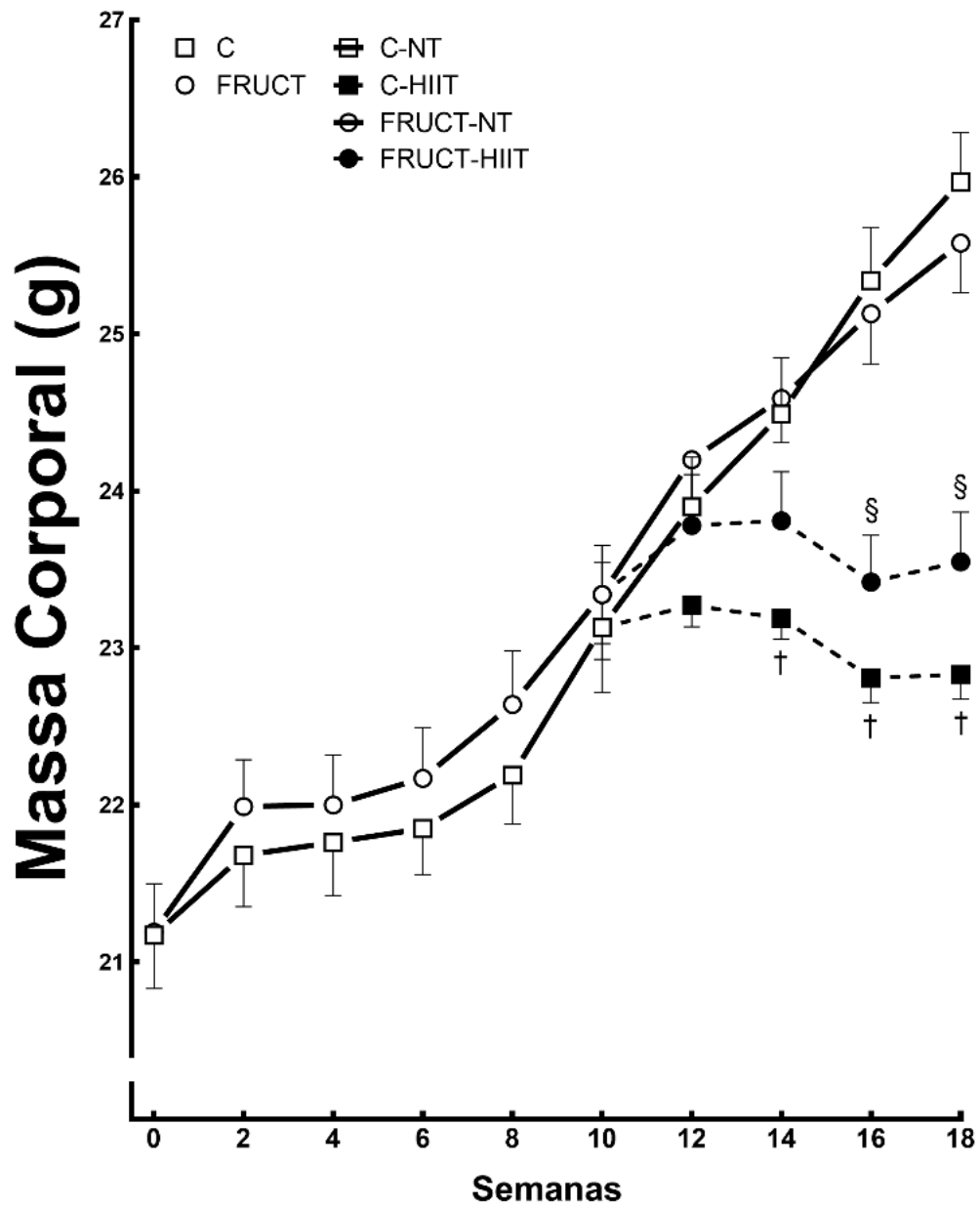
Houve uma redução de 19% no TOTG do grupo C-HIIT quando comparado com o grupo C-NT ($P < 0,001$) e uma diminuição de 16% do grupo F-HIIT em comparação com o grupo F-NT ($P < 0,001$) (Fig. 7).

Tabela 3 - Ingestão alimentar e metabolismo de carboidrato

Dados	C-NT	C-HIIT	F-NT	F-HIIT
Ingestão alimentar (g)	2.9±0.06	2.7±0.46	2.8±0.44	2.6±0.84
Glicose (mmol/L)	8.2±0.5	5.8±0.4†	10.1±0.4†	7.6±0.3‡§
Insulina (µU/ml)	22.0±11.0	9.9±7.9†	27.4±8.1†	10.9±13.0§
HOMA-IR	8.3±1.9	2.5±1.2†	12.3±2.9†	3.7±1.5‡§
QUICKI	0.28±0.08	0.38±0.02†	0.24±0.03†	0.29±0.05‡§
Triglicérides (mg/dL)	69.0±2.2	54.6±2.3†	78.7±6.9†	63.8±10.4§

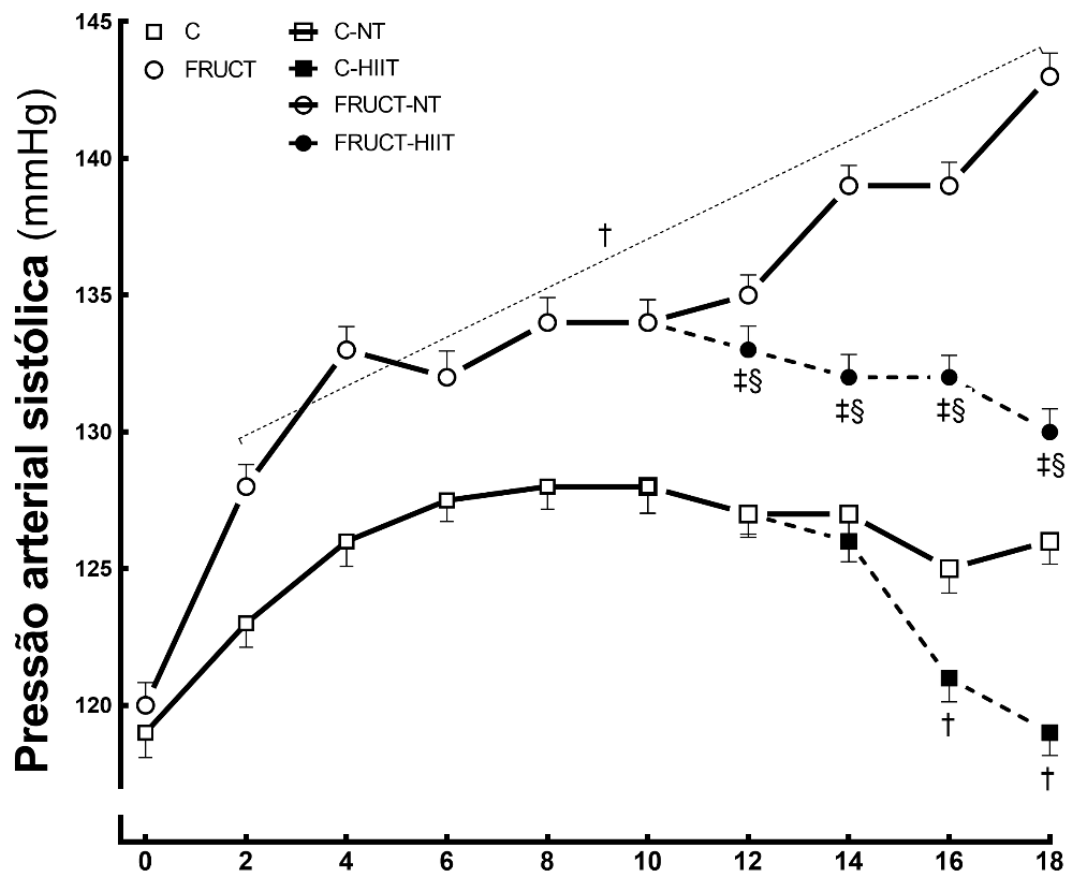
Legenda: Os dados são expressos em média ± DP (n=10). ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, $P < 0,05$ quando: † ≠ C-NT, ‡ ≠ C-HIIT e § ≠ F-NT. Grupos: C (controle); F (frutose), NT (não treinado), HIIT (treinamento de intervalo de alta intensidade).

Figura 5 - Evolução da massa corporal



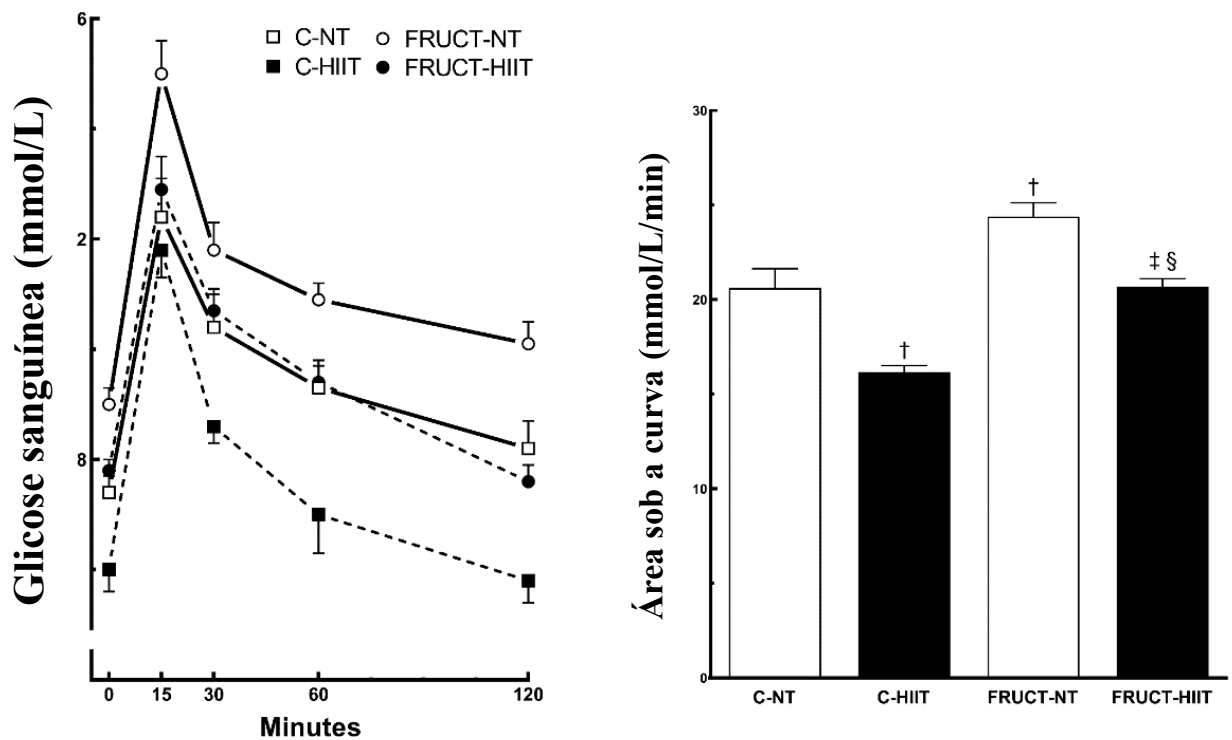
Legenda: Média \pm DP; n= 10. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, $P < 0,05$, quando † \neq C-NT, § \neq F-NT. C, controle; F, frutose; NT, não-treinados; HIIT, treinamento de intervalo de alta intensidade.

Figura 6 - Evolução da pressão arterial sistólica



Legenda: Média \pm DP; n=10. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, $P < 0.05$, quando † \neq C-NT, ‡ \neq C-HIIT, § \neq F-NT.

Figura 7 - TOTG: Evolução da glicemia



Legenda: Média \pm DP, n=10. One-way ANOVA e pós-teste de Holm-Sidak, $P < 0,05$, quando $\dagger \neq$ C-NT, $\ddagger \neq$ C-HIIT, $\S \neq$ F-NT.

5.1.4 Análises plasmáticas

Glicemia em jejum: o grupo F-NT apresentou um aumento de 23% quando comparado ao grupo C-NT ($P < 0.001$). A glicemia em jejum foi 29% menor no grupo C-HIIT quando comparado ao grupo C-NT ($P < 0.001$). Da mesma forma, a glicemia em jejum foi 25% menor no grupo F-HIIT comparado ao grupo F-NT ($P < 0.001$) (Tabela 3).

Insulina em jejum: o grupo F-NT mostrou um aumento de 24% quando comparado com o grupo C-NT ($P < 0.001$). A insulina foi 55% menor no grupo C-HIIT quando comparada ao grupo C-NT ($P = 0.0078$) e 60% menor no grupo F-HIIT quando comparada com o grupo F-NT ($P < 0.001$) (Tabela 3).

HOMA-IR: o grupo F-NT teve HOMA-IR 48% maior quando comparado com o grupo C-NT ($P = 0.0168$). O HOMA-IR foi 70% menor no grupo C-HIIT quando comparado com o grupo C-NT ($P = 0,0004$) e 70% menor no grupo F-HIIT quando comparado com o grupo F-NT ($P < 0.001$) (Tabela 3).

QUICKI: o grupo F-NT teve um índice QUICKI 14% menor quando comparado com o grupo C-NT ($P < 0.001$). Este mesmo foi 36% maior no grupo C-HIIT quando comparado com o grupo C-NT ($P < 0.001$). Da mesma forma, este índice foi 21% maior no grupo F-HIIT quando comparado com o grupo F-NT ($P < 0.001$) (Tabela 3).

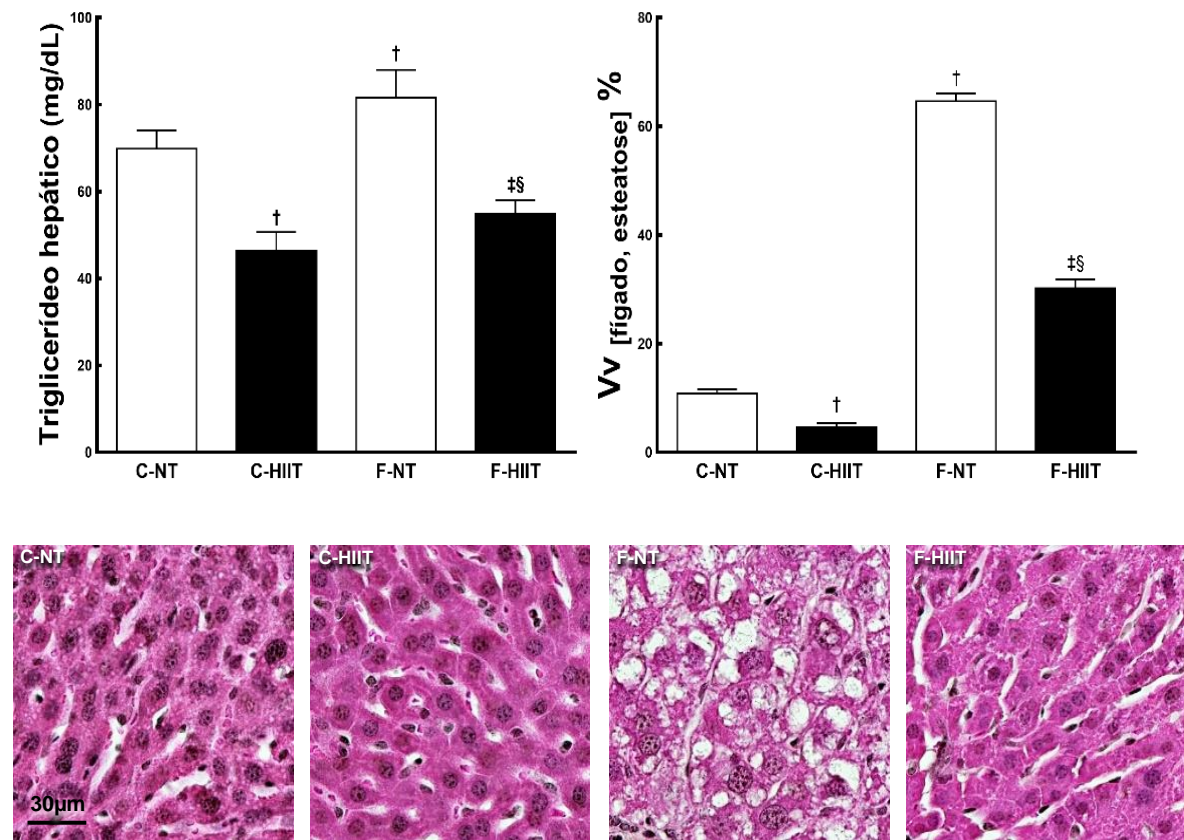
Triglicérides: o grupo F-NT teve uma concentração de triglicérides 14% maior do que o grupo C-NT ($P = 0,0469$). O nível de triglicérides foi 21% menor no grupo C-HIIT do que no grupo C-NT ($P = 0,0016$) e foi reduzido no grupo F-HIIT em comparação com o grupo F-NT (-19%; $P = 0,0012$) (Tabela 3).

5.1.5 Fígado

Os triglicérides hepáticos apresentaram um aumento no grupo F-NT em comparação com o grupo C-NT (+17%; $P = 0,0006$). O HIIT diminuiu os valores de triglicérides hepáticos no grupo C-HIIT em comparação com o grupo C-NT (-34%; $P < 0,001$), bem como no grupo F-HIIT em comparação com o grupo F-NT (-33%; $P < 0,001$) (Fig. 8).

Houve um aumento da esteatose hepática no grupo F-NT quando comparado com o grupo C-NT (+498%; $P < 0.001$). Além disso, ambos os grupos HIIT apresentaram grau de esteatose hepática reduzida em comparação aos grupos NT (-57%, para o grupo C-HIIT em comparação com o grupo C-NT e -53% para o grupo F-HIIT em comparação com o grupo F-NT; $P < 0,001$). O grupo F-HIIT também ainda teve mais esteatose hepática do que o grupo C-HIIT (+557%; $P < 0.001$) (Fig. 8).

Figura 8 - Triglicérides hepático e densidade de volume de esteatose hepática [Vv (fígado, esteatose)]

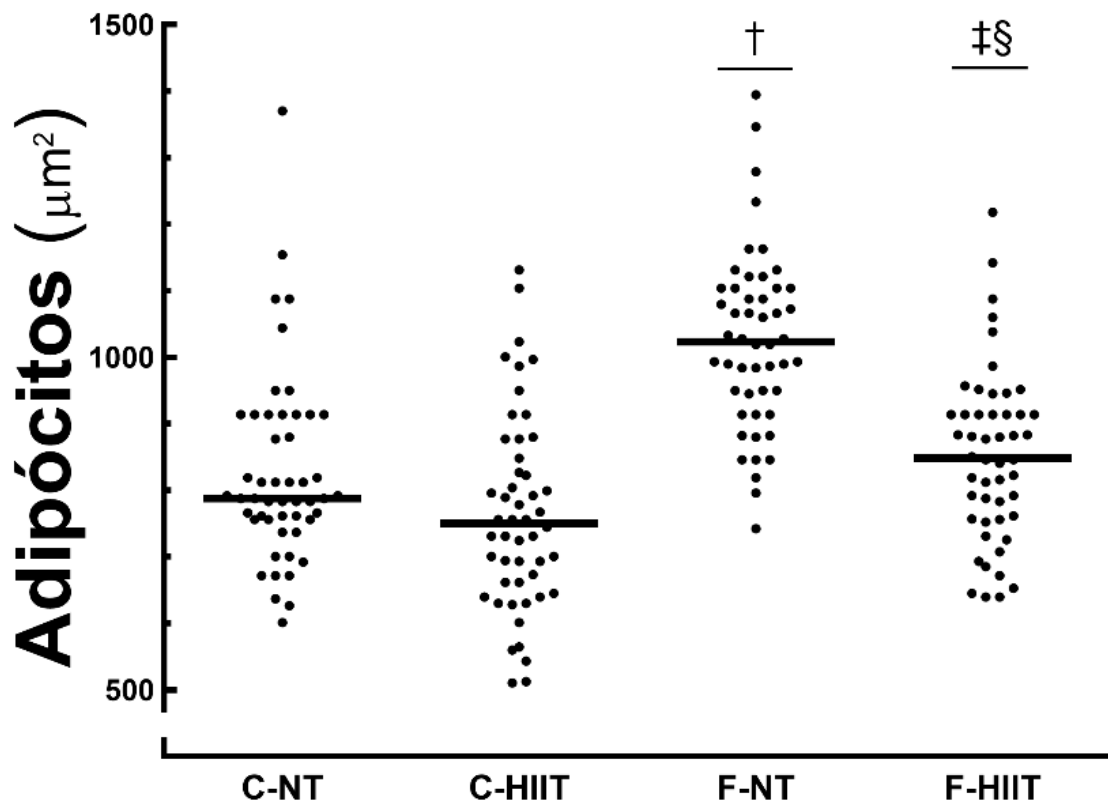


Legenda: Média \pm DP; n=5. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, $P < 0.05$, quando † \neq C-NT, ‡ \neq C-HIIT, § \neq F-NT. As fotomicrografias representativas foram coradas com hematoxilina e eosina e estão no mesmo aumento.

5.1.6 Área transversa média do adipócito

A área transversa média dos adipócitos foi 24% maior no grupo F-NT do que no grupo C-NT ($P < 0.001$), mas nenhuma diferença foi observada entre os grupos C-HIIT e C-NT. A área transversal de adipócitos foi 17% menor no grupo F-HIIT em comparação com o grupo F-NT ($P < 0.001$) (Fig. 9).

Figura 9 - Dispersão da área transversal média de adipócitos



Legenda: Mediana, n=10/grupo. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, $P < 0,05$, quando † \neq C-NT, ‡ \neq C-HIIT, § \neq F-NT.

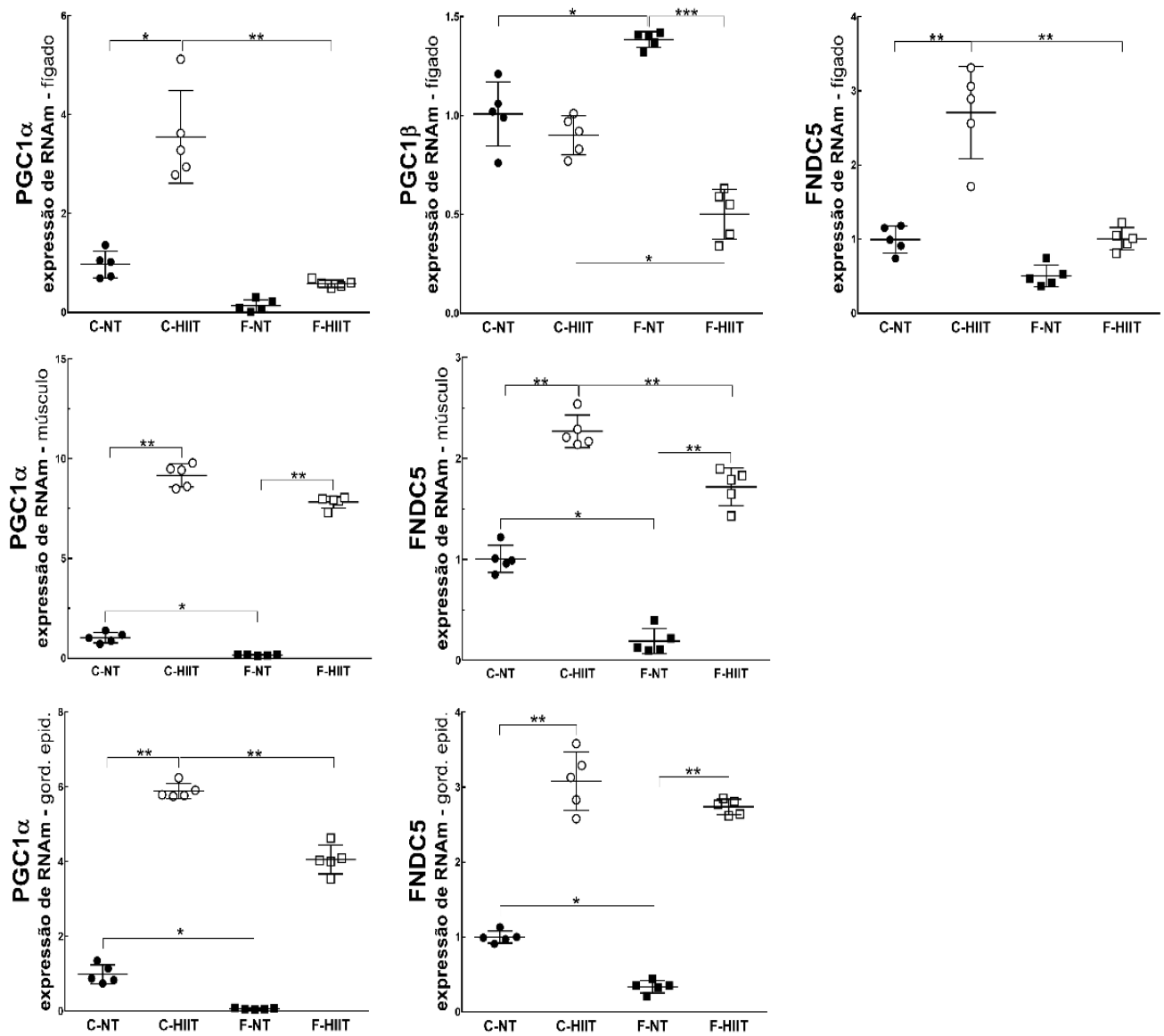
5.1.7 Expressão gênica de PGC1alfa, PGC1beta e FNDC5

Fígado: a expressão de PGC-1alfa foi 272% maior no grupo C-HIIT em comparação com o grupo C-NT ($P = 0,0002$). Por outro lado, no grupo F-HIIT, o resultado do PGC-1alfa foi semelhante ao grupo F-NT e reduzido em comparação com o grupo C-HIIT (-84%; $P < 0,001$). PGC-1beta foi aumentado no grupo F-NT em comparação com o grupo C-NT (+38%, $P = 0,0318$). Foi reduzido no grupo F-HIIT quando comparado com os grupos C-HIIT (-49%, $P = 0,0169$) e F-NT (-66%, $P < 0,0001$) (Fig. 6B). O FNDC5 foi 147% maior no grupo C-HIIT quando comparado com o grupo C-NT ($P = 0,0023$) e 58% menor no grupo F-HIIT em comparação com o grupo C-HIIT ($P = 0,0024$) (Fig.10).

Tecido adiposo branco (epididimário): a expressão de PGC-1alfa foi 94% menor no grupo F-NT em comparação ao grupo C-NT ($P = 0,0024$), 463% maior no grupo C-HIIT quando comparado com o grupo C-NT ($P = 0,0002$) e 6712% maior no grupo F-HIIT em comparação ao grupo F-NT ($P = 0,0013$). A expressão de FNDC5 foi 67% menor no grupo F-NT em comparação ao grupo C-NT ($P = 0,0052$), 206% maior no grupo C-HIIT em comparação ao grupo C-NT ($P = 0,001$) e 713% maior no grupo F-HIIT quando comparado ao grupo F-NT ($P < 0,001$) (Fig. 10).

Músculo gastrocnêmico: a expressão de PGC-1alfa foi 85% menor no grupo F-NT quando comparado ao grupo C-NT ($P = 0,0081$), 783% maior no grupo C-HIIT em comparação ao grupo C-NT ($P < 0,001$) e 4.759% maior no grupo F-HIIT em comparação ao grupo F-NT ($P < 0,001$). A expressão de FNDC5 foi 82% menor no grupo F-NT em comparação com o grupo C-NT ($P = 0,0053$). No entanto, o FNDC5 foi 130% maior no grupo C-HIIT em comparação ao grupo C-NT ($P = 0,0002$) e 818% maior no grupo F-HIIT comparado com o grupo F-NT ($P < 0,001$) (Fig. 10).

Figura 10 - Expressões gênicas de PGC1alfa, PGC1beta e FNDC5



Legenda: Média \pm DP; n=6. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

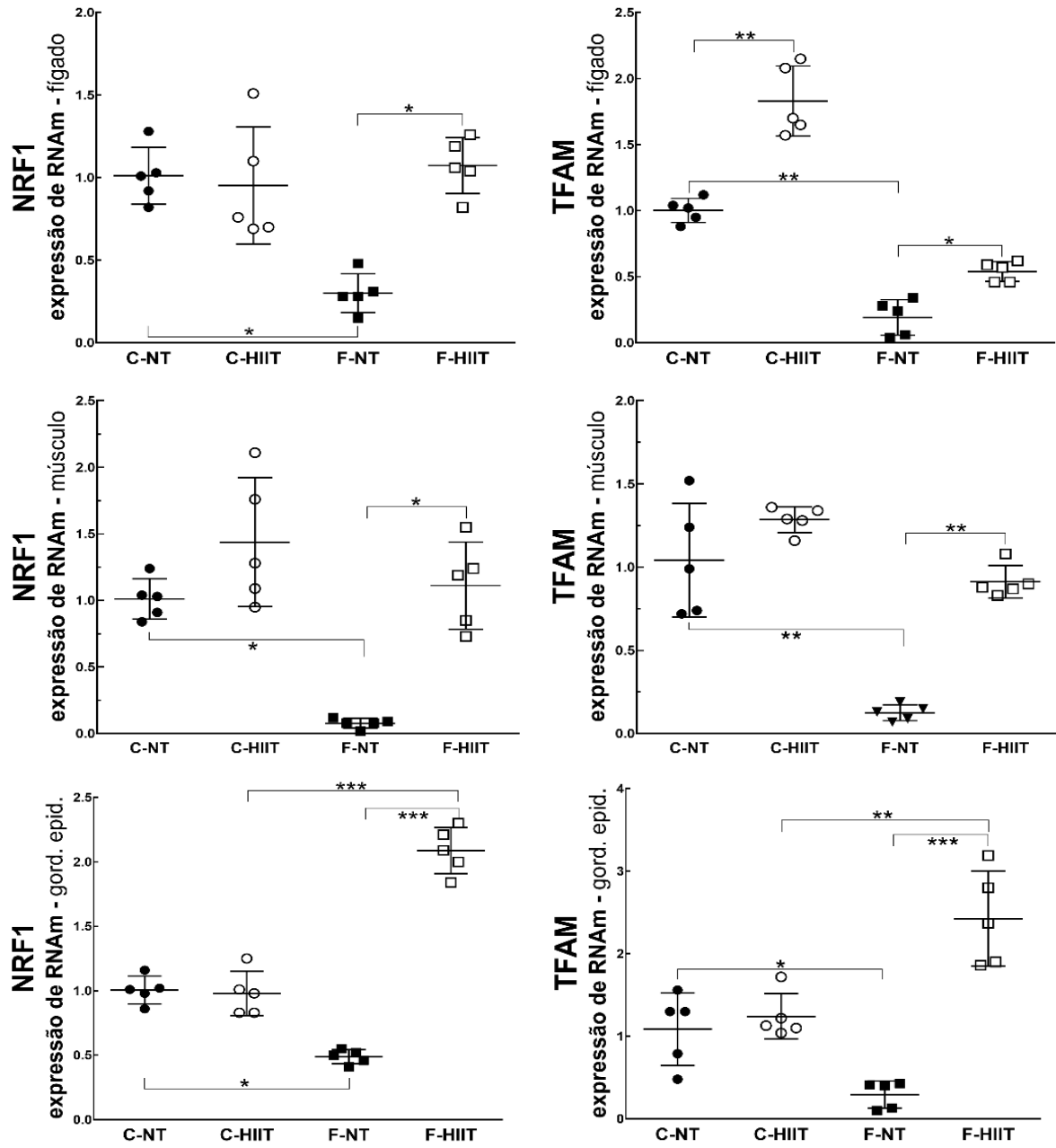
5.1.8 Biogênese mitocondrial

Fígado: a expressão de NRF1 foi reduzida no grupo F-NT em comparação ao grupo C-NT (-70%; $P = 0.0067$), porém a expressão de NRF1 foi elevada no grupo F-HIIT quando comparado ao grupo F-NT (+255%; $P = 0.0038$). O TFAM foi reduzido no grupo F-NT em comparação com o grupo C-NT (-86%; $P = 0,0002$). Nos grupos HIIT, a expressão de TFAM foi aumentada (+86%; $P = 0,0002$ no grupo C-HIIT vs. C-NT e 213%; $P = 0,0157$ no grupo F-HIIT vs. F-NT) (Fig. 11).

Tecido adiposo epididimário: as expressões de NRF1 e TFAM foram menores no grupo F-NT quando comparadas ao grupo C-NT (NRF1: -51%, $P = 0.0045$; TFAM: -76%, $P = 0.0428$). No grupo F-HIIT, NRF1 foi 315% maior ($P < 0,0001$) e TFAM foi 832% maior ($P < 0,0001$) em comparação ao grupo F-NT (Fig. 11).

Músculo Gastrocnêmio: as expressões de NRF1 e TFAM foram menores no grupo F-NT vs. C-NT (NRF1: -93%, $P = 0.0053$; TFAM: -89%, $P = 0,0002$). O NRF1 e o TFAM foram aumentados no grupo F-HIIT (NRF1: +1291%, $P = 0.0104$; TFAM: +675%, $P = 0.0021$) em comparação ao grupo F-NT (Fig. 11).

Figura 11 - Expressões gênicas de NRF1 e TFAM



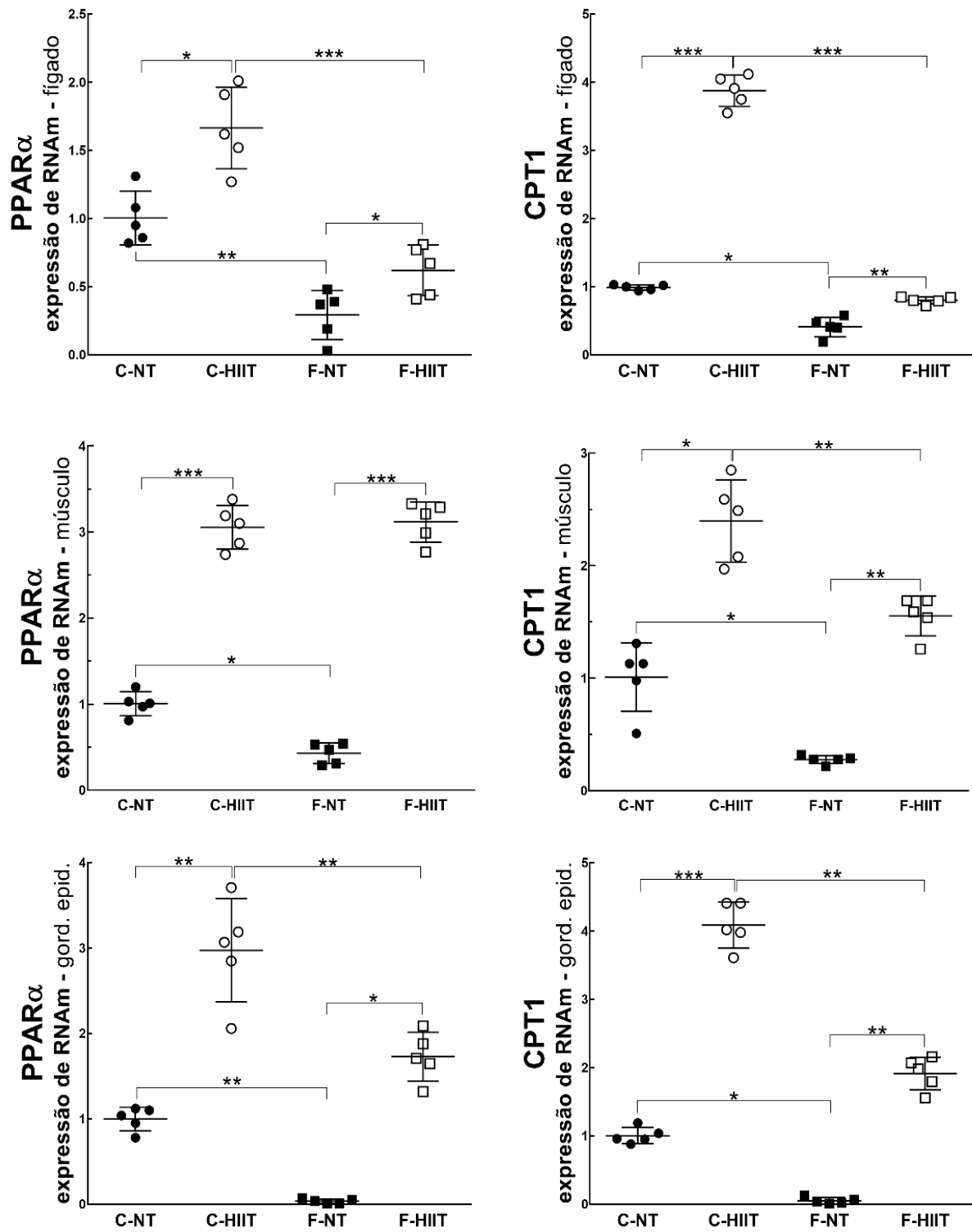
Legenda: Média \pm DP; n=6. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

5.1.9 Beta-oxidação

Fígado: as expressões para ambos PPARalfa e CPT1 foram reduzidas no F-NT grupo em comparação com o grupo C-NT (PPARalfa: -76%, $P = 0,0005$; CPT1: -60%, $P = 0,0019$). Em contraste, essas expressões foram elevadas no grupo C-HIIT vs. C-NT (PPARalfa: +67%, $P = 0,0025$; CPT1: +280%, $P < 0,0001$) e no grupo F-HIIT vs. F-NT (PPARalfa: +139%, $P = 0,0374$; CPT1: +99%, $P = 0,0177$) (Fig. 12).

Tecido adiposo epididimário: as expressões de PPARalfa e CPT1 foram reduzidas no grupo F-NT em comparação com o grupo C-NT (PPARalfa: -97%, $P = 0,0173$; CPT1: -95%, $P = 0,0075$). Em contraste, PPARalfa e CPT1 foram aumentados no grupo C-HIIT vs. C-NT (PPARalfa: +196%, $P = 0,0006$; CPT1: +311%, $P = 0,0001$). As expressões de PPARalfa e CPT1 foram aumentadas no grupo F-HIIT vs. F-NT (PPARalfa: +4777%, $P = 0,0017$; CPT1: +3350%, $P = 0,0002$) (Fig. 12).

Músculo gastrocnêmio: as expressões de PPARalfa e CPT1 foram diminuídas no grupo F-NT em comparação com o grupo C-NT (PPARalfa: -58%, $P = 0,0121$; CPT1: -76%, $P = 0,0236$) e foram aumentadas no grupo C-HIIT em comparação ao grupo C-NT (PPARalfa: +203%, $P = 0,0001$; CPT1: +115%, $P = 0,0021$). As expressões de PPARalfa e CPT1 foram aumentados no grupo F-HIIT vs. F-NT (PPARalfa: +631%, $P < 0,0001$; CPT-1: +500%, $P = 0,0006$) (Fig. 12).

Figura 12 - Expressões gênicas de PPAR α e CPT1

Legenda: Média \pm DP, n=6. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

5.1.10 ANOVA de dois fatores

A Tabela 4 resume os achados da ANOVA de dois fatores para dieta vs. HIIT: para biometria, houve interação na massa corporal e pressão arterial sistólica; para a bioquímica, não houve interação significativa; para o músculo, a interação ocorreu nos genes relacionados à biogênese mitocondrial e PPARalfa; para o tecido adiposo epididimário, a interação ocorreu nos genes envolvidos na biogênese mitocondrial e CPT1; e para o fígado, as interações estavam nos genes da biogênese mitocondrial, CPT1, PGC1alfa, PGC1beta, FNDC5 e na esteatose hepática.

Tabela 4 - ANOVA de dois fatores: Frutose vs. HIIT

ANOVA dois fatores	% de variação e teste de significância					
	Interação		Frutose		HIIT	
	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>
BIOMETRIA						
Massa corporal	3.2	0.045	0.3	ns	69,7	<0.001
Ingestão alimentar	0	Ns	0.8	ns	0	ns
Pressão arterial	2.9	<0.001	63.7	<0.001	32.5	<0.001
BIOQUÍMICA						
Glicose de jejum	0	Ns	34.4	<0.001	60.3	<0.001
Insulina de jejum	0.8	Ns	1.8	ns	36.0	0.003
HOMA-IR	2.7	Ns	9.2	0.001	70.9	<0.001
QUICKI	3.4	Ns	22.7	0.011	30.3	0.004
Triglicérides	0	Ns	20.2	0.002	48.5	<0.001
FÍGADO						
Triglicérides	0.3	Ns	12.6	<0.001	78.0	<0.001
Esteatose	9.0	<0.001	71.9	<0.001	18.8	<0.001
PGC-1alfa	14.6	0.003	45.7	<0.001	28.4	<0.001
PGC-1beta	33.4	<0.001	0.19	ns	50.7	<0.001
FNDC5	7.11	0.031	34.57	<0.001	37.88	<0.001
NRF1	31.2	0.001	14.8	0.014	22.8	0.004
TFAM	3.7	0.005	68.7	<0.001	21.9	<0.001
PPARalfa	2.2	Ns	65.5	<0.001	19.1	0.002
CPT1	19.7	<0.001	44.5	<0.001	34.7	<0.001
TEC.ADIP. EPIDIM						
Adipócito	3.1	Ns	20.8	0.034	14.0	ns
PGC-1alfa	0.6	0.018	8.2	<0.001	89.8	<0.001
FNDC5	0.5	Ns	4.7	0.003	91.4	<0.001
NRF1	43.2	<0.001	4.8	0.004	44.9	<0.001
TFAM	30.7	<0.001	0.5	ns	50.9	<0.001
PPARalfa	0.4	Ns	23.8	<0.001	62.4	<0.001
CPT1	4.8	<0.001	28.1	<0.001	64.2	<0.001
MÚSCULO						
PGC-1alfa	0	Ns	2.0	<0.001	97.3	<0.001
FNDC5	0.4	Ns	19.6	<0.001	75.7	<0.001
NRF1	8.5	0.016	34.6	<0.001	38.1	<0.001
TFAM	9.2	0.007	45.4	<0.001	29.5	<0.001
PPARalfa	1.7	0.011	1.2	0.032	93.8	<0.001
CPT1	0	Ns	23.7	<0.001	63.0	<0.001

5.2 Subprojeto 2

Alterações promovidas pelo HIIT na formação de adipócitos “beges” (fenômeno de *browning*) no tecido adiposo branco subcutâneo.

5.2.1 Ganho de massa corporal e gasto energético

Os grupos HIIT mostraram uma perda de MC em comparação aos seus respectivos grupos NT (C-HIIT vs. C-NT, -86%, $P < 0.001$; F-HIIT vs. F-NT, -18%, $P < 0.001$). Além disso, a MC também foi menor comparando C-HIIT vs. F-HIIT (-47%, $P < 0.001$). Um gasto energético aumentado acompanhou a redução da MC nos grupos HIIT (C-NT vs. C-HIIT, +14%, $P < 0.001$; F-NT vs. F-HIIT, +12%, $P < 0.001$). Além disso, F-HIIT mostrou menor gasto energético em comparação com o grupo C-HIIT (-8%, $P < 0.001$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Biometria e gasto energético

Dados	C-NT	C-HIIT	F-NT	F-HIIT
Ganho de MC (g)	+1.11 ± 0.10	-2.06 ± 0.18†	+0.93 ± 0.08†	-1.10 ± 0.10‡§
Gasto energético (kcal/day/kg ^{0.75})	206.9 ± 4.8	235.2 ± 2.9†	193.0 ± 4.3†	216.3 ± 6.7‡§
Massa TABs. (g)	0.46 ± 0.08	0.23 ± 0.04†	0.51 ± 0.09†	0.39 ± 0.03‡§

Legenda: Os dados são expressos como a média ± DP (n = 6). $P < 0,05$, † em comparação com o grupo C-NT, ‡ em comparação com o grupo C-HIIT, § comparado ao grupo F-NT (ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak). Abreviações: C, controle; F, frutose; HIIT, treinamento de intervalos de alta intensidade; NT, não-treinado.

5.2.2 Tecido adiposo branco subcutâneo (TABs)

O consumo de frutose aumentou a massa do TABs (C-NT vs. F-NT, +11%, $P = 0.0402$; C-HIIT vs. F-HIIT, +70%, $P < 0.0001$). Os grupos HIIT tiveram uma redução da massa de TABs quando comparados com os respectivos grupos NT (C-HIIT, -50%, $P < 0.0001$; F-HIIT, -24%, $P = 0.0388$) (Tabela 5).

5.2.3 Browning

O consumo crônico da dieta rica em frutose (F-NT) resultou em uma diminuição da expressão gênica de UCP1 (-41%, $P = 0.0029$), FNDC5 (-48%, $P = 0.0109$), CD137 (-54%, $P = 0.0004$) e no aumento da expressão gênica de PPAR γ (+38%, $P < 0.0001$), quando comparado ao grupo C-NT. Consequentemente o grupo F-NT também teve uma diminuição na expressão proteica de UCP1 (-45%, $P = 0.0408$), PRDM16 (-57%, $P = 0.0197$) e CD137 (-35%, $P = 0.0397$) quando comparado ao grupo C-NT (Fig. 13).

Os grupos HIIT, quando comparado aos seus respectivos grupos NT, tiveram um aumento na expressão gênica de UCP1 (C-HIIT +87%, $P < 0.0001$; F-HIIT +124%, $P < 0.0001$), PRDM16 (C-HIIT +59%, $P = 0.0180$; F-HIIT +83%, $P = 0.0318$), FNDC5 (C-HIIT +154%, $P < 0.0001$; F-HIIT +187%, $P < 0.0001$) e CD137 (C-HIIT +35%, $P = 0.0123$; F-HIIT +127%, $P = 0.0003$), e diminuição na expressão gênica de PPAR γ (C-HIIT -33%, $P = 0.0002$; F-HIIT -22%, $P = 0.0003$). Da mesma forma, viu-se a expressão proteica de UCP1 (C-HIIT +66%, $P = 0.0082$; F-HIIT +90%, $P = 0.0329$), PRDM16 (C-HIIT +45%, $P = 0.0353$; F-HIIT +123%, $P = 0.0240$) e CD137 (C-HIIT +68%, $P = 0.0007$; F-HIIT +69%, $P = 0.0148$) (Fig. 13).

O consumo de frutose nos grupos HIIT (C-HIIT vs. F-HIIT) resultou em uma diminuição na expressão gênica de UCP1 (-30%, $P = 0.0003$), FNDC5 (-42%, $P < 0.0001$), CD137 (-24%, $P = 0.0166$), e um aumento no PPAR γ (+61%, $P < 0.0001$). Não houve diferença significativa na expressão gênica de PRDM16. Do mesmo modo, foram encontrados resultados semelhantes na expressão proteica de UCP1 (-37%, $P < 0.0001$), PRDM16 (-33%,

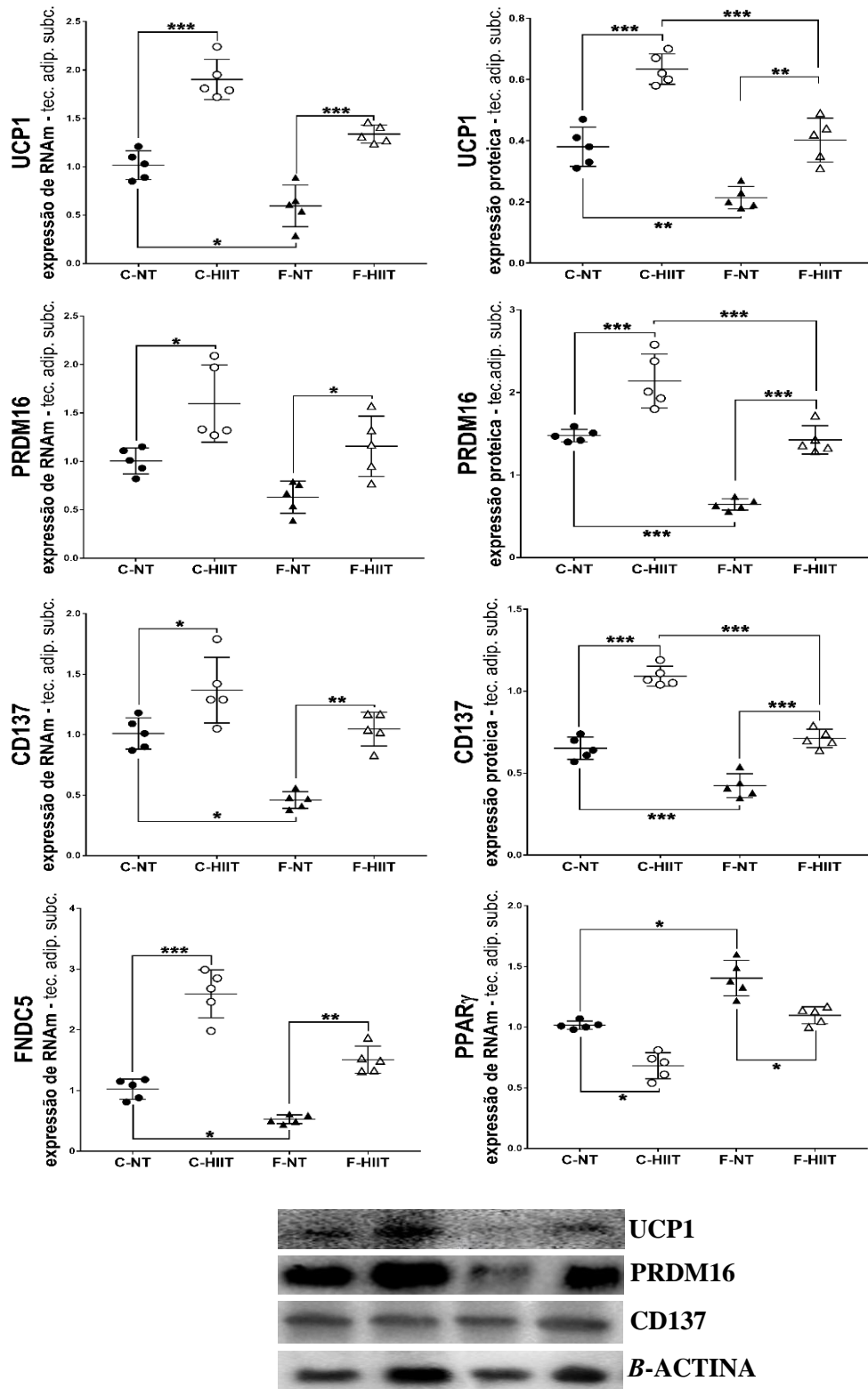
$P < 0.0001$) e CD137 (-35%, $P < 0.0001$) (Fig.9). Os grupos HIIT tiveram imunomarcação de UCP1 na imunohistoquímica mais evidente, e adipócitos multiloculares no TABs (Fig. 13).

5.2.4 Biogênese mitocondrial do TABs

O uso crônico da dieta rica em frutose nos grupos NT (F-NT vs. C-NT) levou a uma diminuição da expressão gênica de PGC1alfa (-60%, $P = 0.0219$), NRF1 (-41%, $P = 0.0287$) e TFAM (-62%, $P = 0.0026$) (Fig. 15).

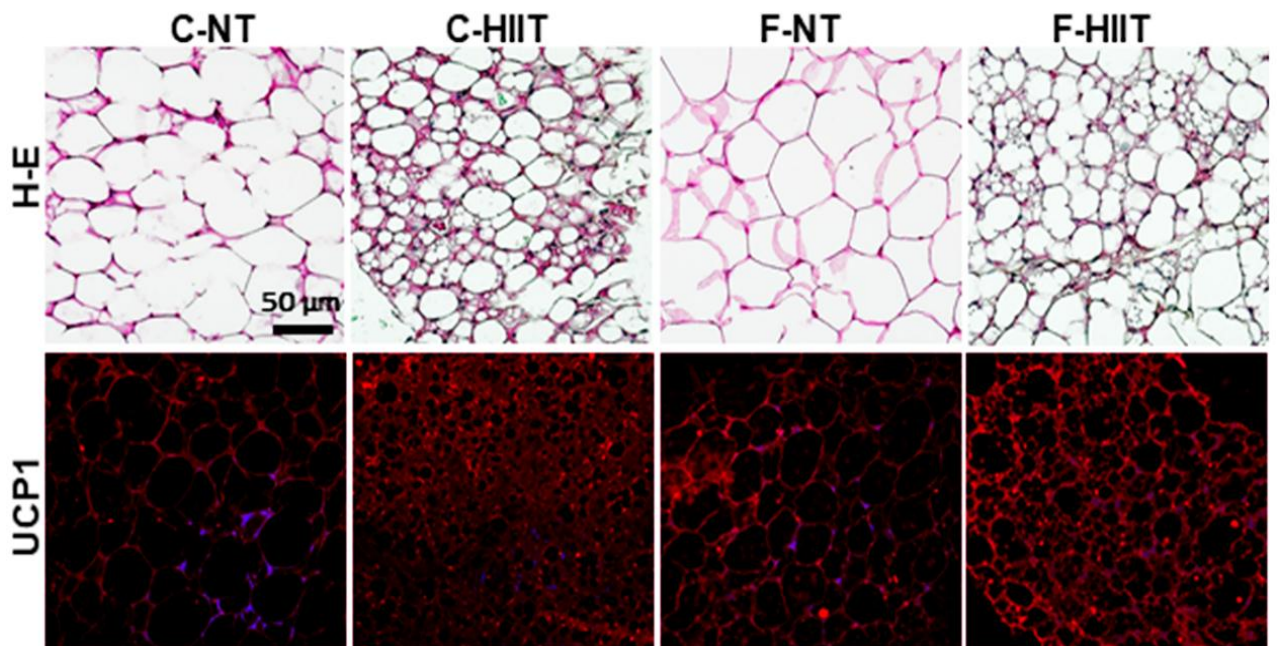
Os grupos HIIT, quando comparados aos grupos NT, apresentaram uma maior expressão gênica de PGC1alfa (C-HIIT +419%, $P < 0.0001$; F-HIIT +836%, $P < 0.0001$) e NRF1 (C-HIIT +45% $P = 0.0287$; F-HIIT + 232%, $P < 0.0001$). No grupo F-HIIT, a expressão do gene TFAM foi diferente em relação ao grupo F-NT (+190%, $P = 0.0009$) (Fig. 15).

O consumo crônico de frutose nos grupos HIIT (C-HIIT vs. F-HIIT) resultou em uma diminuição da expressão gênica de PGC1alfa (-28%, $P < 0.0001$) e um aumento de NRF1 (+34%, $P = 0.0247$). A expressão gênica do TFAM não apresentou diferença entre os grupos (Fig. 15).

Figura 13 - Marcadores de *browning* no tecido adiposo subcutâneo

Legenda: Os valores são da média \pm DP. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$. Expressões gênica e proteica de UCP1, PRDM16 e CD137, expressão gênica de FNDC5 e expressão gênica de PPAR γ . Expressões proteicas de UCP1, PRDM16 (e acima, bandas representativas das expressões proteicas).

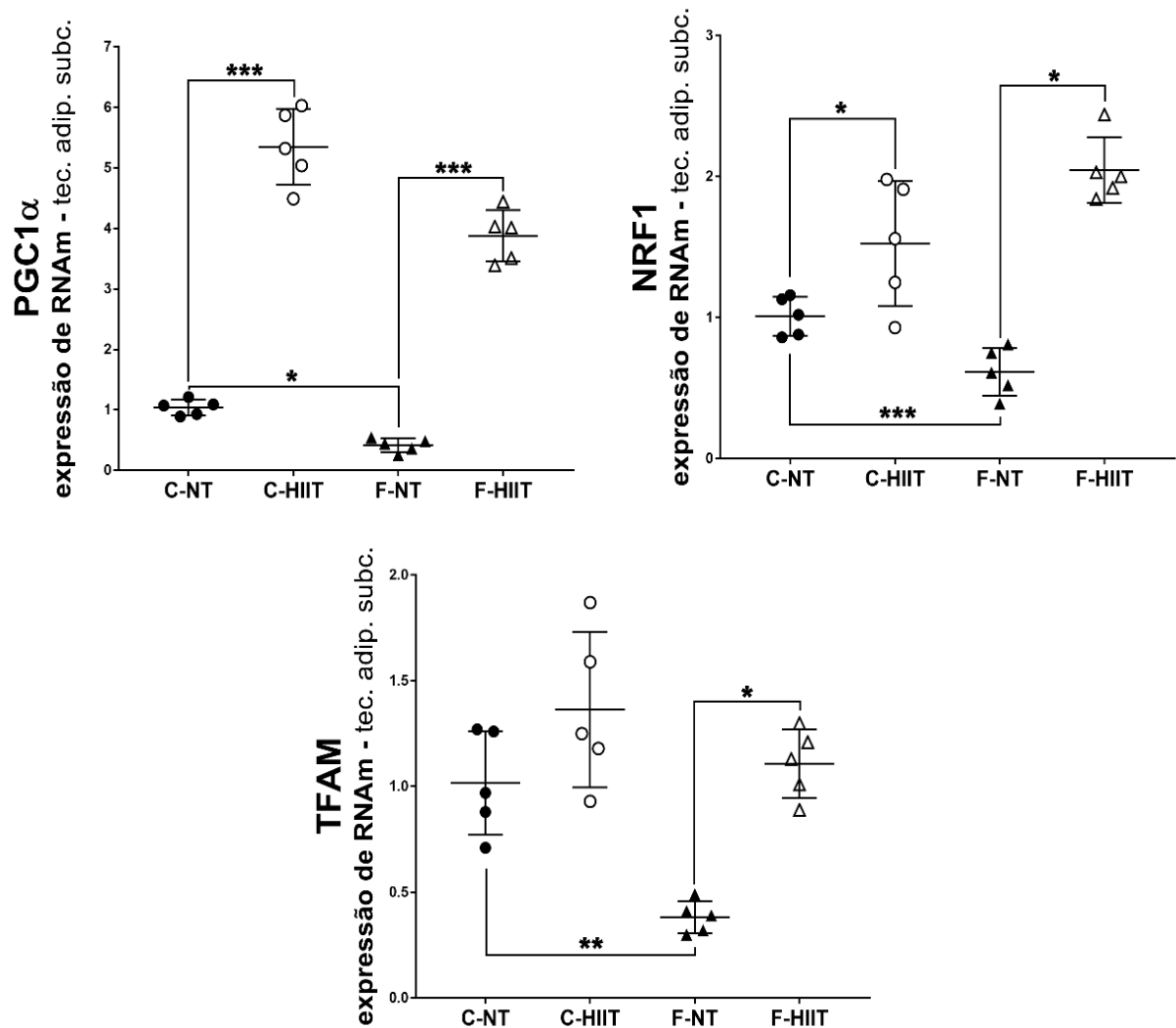
Figura 14 - Fotomicrografias de tecido adiposo subcutâneo



Legenda: A calibração da barra é a mesma para todas as fotomicrografias. Linha superior: coloração por hematoxilina e eosina. Linha inferior: imunofluorescência e microscopia confocal a laser.

O grupo C-NT apresentou adipócitos brancos típicos, enquanto o grupo F-NT apresentou adipócitos aumentados. Ambos os grupos treinados (C-HIIT e F-HIIT) apresentaram adipócitos semelhantes a gordura marrom dispersos em TABs. O aumento da imunomarcagem de UCP1 (vermelho) confirmou esses resultados nos grupos HIIT em comparação com os grupos NT (C-NT e F-NT). Grupos: C, controle; F, frutose; NT, não treinado; HIIT, treinamento de intervalo de alta intensidade. Abreviações: domínio PR contendo 16 (PRDM16), proteína de desacoplamento (UCP) 1, tecido adiposo branco subcutâneo (TABs).

Figura 15 - Marcadores de biogênese mitocondrial no tecido adiposo subcutâneo

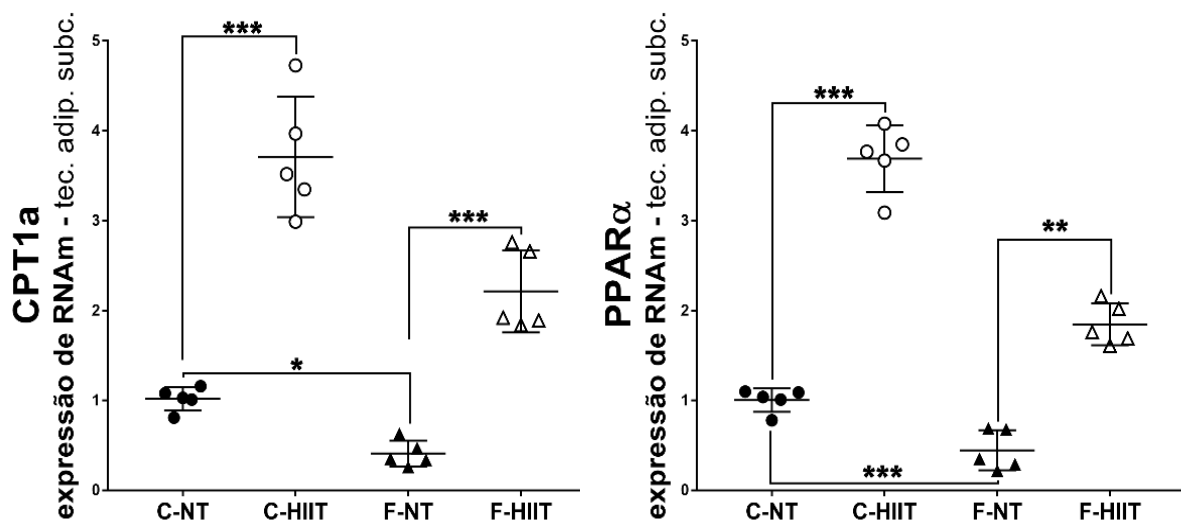


Legenda: Expressão gênica de PGC1 α , NRF1 e TFAM. Os valores são apresentados por média \pm DP. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak. Grupos: C, controle; F, frutose; NT, não-treinado; HIIT, treinamento intervalado de alta intensidade. Abreviaturas: fator respiratório nuclear (NRF) 1, receptor de ativador ativado por proliferador de peroxisoma 1 alfa (PGC1 α) e fator de transcrição mitocondrial (TFAM).

5.2.5 Beta-oxidação do TABs

O consumo de frutose nos grupos NT (F-NT vs. C-NT) diminuiu as expressões gênicas de CPT1a (-60%, $P = 0,0346$) e PPARalfa (-56%, $P = 0,0031$). No entanto, observou-se aumento nas expressões gênicas quando comparando os grupos HIIT vs. NT (CPT1a: C-HIIT vs. C-NT, +265%, $P < 0,0001$; F-HIIT vs. F-NT, +440%, $P < 0,0001$; PPARalfa: C-HIIT vs. C-NT, +268%, $P < 0,0001$; F-HIIT vs. F-NT, +314%, $P < 0,0001$). Além disso o consumo de frutose nos grupos HIIT (C-HIIT vs. F-HIIT) diminuiu a expressão gênica de PGC1alfa (-28%, $P < 0,0001$) e aumentou NRF1 (+34%, $P = 0,0247$). A expressão do gene TFAM não mostrou a diferença entre os grupos (Fig. 16).

Figura 16 - Marcadores de beta-oxidação no tecido adiposo subcutâneo



Legenda: Expressão gênica de CPT1a e PPARalfa. Os valores são apresentados por média \pm DP. ANOVA de um fator e pós-teste de Holm-Sidak, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$. Grupos: C, controle; F, frutose; NT, não-treinado; HIIT, treinamento intervalado de alta intensidade. Abreviaturas: Carnitina Palmitoil Transferase Ia (CPT1a), receptor ativado por proliferador de peroxisoma (PPARalfa).

5.2.6 ANOVA de dois fatores

A Tabela 6 resume os resultados do ANOVA de dois fatores para dieta vs. HIIT no TABs: para a biometria ocorreu interação apenas no gasto energético, para o *Western blot*,

não houve interação nas expressões proteicas do TABs e no RT-qPCR houve uma interação nas expressões gênicas de FNDC5, CPT1a e PPARalfa) e na biogênese mitocondrial, a interação ocorreu em NRF1 e PGC1alfa.

Tabela 6 - ANOVA de dois fatores: Frutose vs. HIIT

ANOVA de dois fatores	% de variação e teste de significância					
	Interação		Frutose		HIIT	
	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>	%	<i>P</i>
Biometria						
Massa corporal	3,2	0,0450	0,3	NS	69,7	< 0,001
Gasto energético	0,5	NS	21,1	< 0,001	52,3	< 0,001
Massa de TABs	5,0	0,0114	18,4	< 0,001	51,1	< 0,001
RT-qPCR						
UCP1	0,6	NS	23,7	< 0,001	66,2	< 0,001
PRDM16	0,2	NS	23,0	= 0,0044	43,3	0,0003
PPARGama	0,1	NS	54,7	< 0,001	34,7	< 0,001
FNDC5	3,4	0,0158	24,6	< 0,001	64,4	< 0,001
CD137	2,5	NS	36,7	< 0,001	43,1	< 0,001
PGC1alfa	1,1	0,0252	6,5	< 0,001	89,6	< 0,001
NRF1	14,9	0,0018	0,3	NS	67,7	< 0,001
TFAM	5,1	NS	28,3	= 0,007	40,8	= 0,001
CPT1a	2,9	0,0282	15,9	< 0,001	73,2	< 0,001
PPARalfa	6,6	< 0,001	23,1	< 0,001	67,0	< 0,001
Western-blot						
UCP1	0,7	NS	31,1	< 0,001	37,6	< 0,001
PRDM16	0,3	NS	35,5	< 0,001	31,1	< 0,001
CD137	1,9	NS	30,7	< 0,001	43,9	< 0,001

Abreviações: CD137, cluster de diferenciação 137; CPT-1a, carnitina palmitoiltransferase-1a; FNDC5, proteína contendo o domínio da fibronectina tipo III-5; NRF1, fator respiratório nuclear 1; PGC1alfa, ativador ativado por proliferador de peroxissoma ativado por gamma coativador 1 alfa; PPARalfa, receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma; PPARgama, receptor gamma de ativado por proliferador de peroxissoma; PRDM16, domínio PR contendo 16; TABs, tecido adiposo branco subcutâneo; TFAM, fator de transcrição mitocondrial A; UCP1, proteína de desacoplamento 1.

6 DISCUSSÃO

6.1 Subprojeto 1

O estudo do consumo crônico de frutose é relevante hoje porque inúmeros produtos contém frutose e estes podem causar efeitos metabólicos adversos nas pessoas (13). No modelo que analisamos, encontramos pressão arterial elevada, resistência à insulina, elevação dos triglicérides plasmáticos, esteatose hepática e adipócitos hipertrofiados o que concordou com relatos prévios (89, 90). Além disso, observamos os efeitos adversos da frutose associados às expressões alteradas em PGC1alfa, PGC1beta, FNDC5 e expressões de genes da beta-oxidação e marcadores de biogênese mitocondrial. No fígado, os efeitos da frutose reduziram o PGC1alfa em associação com o aumento do acúmulo de triglicérides, o que concorda com relato prévio (12). De acordo, a frutose também mostrou um efeito inibitório sobre o PPARAlfa e CPT1, corroborando para o acúmulo de lipídios (91), bem como a redução de PGC1b preveniu a hipertrigliceridemia induzida por frutose (92).

Os efeitos da frutose no TAB epididimário estão relacionados com o aumento do adipócito, que é um efeito já relatado (90) e adipócitos hipertrofiados têm diminuição da beta-oxidação e da biogênese mitocondrial (1). Em ratos alimentados com frutose, a beta-oxidação foi reduzida no músculo esquelético (93). No entanto, em relação à biogênese mitocondrial, os efeitos da frutose sobre o músculo esquelético ainda são uma questão de debates. Ratos alimentados com frutose apresentaram aumento da biogênese mitocondrial no músculo esquelético (94), mas a exposição dos miotubos L6 à frutose levou a uma lesão mitocondrial (95).

No presente estudo os benefícios significativos do HIIT foram confirmados pela diminuição da MC, da PAS, da esteatose hepática e da área dos adipócitos, concordando com a literatura em diferentes modelos animais (20, 96). O HIIT também melhora a tolerância à glicose/resistência à insulina e nos níveis de triglicérides plasmáticos, como relatado em outros lugares em outros modelos (90, 97). Além disso, o HIIT foi capaz de aumentar a expressão de PGC1a e FNDC5, aumentando a biogênese mitocondrial e a beta-oxidação no fígado, TAB epididimário e músculo esquelético. Podemos considerar os efeitos benéficos do HIIT paralelamente aos de um tratamento medicamentoso (metformina), que mesmo com a

continuidade da ingestão de frutose, reverteu, pelo menos parcialmente, a lesão hepática e impediu progressão da DHGNA para estágios mais graves desta doença (98).

No geral, o HIIT também beneficiou os animais do grupo controle (C). De acordo com relatos anteriores houve melhora da intolerância à glicose e do acúmulo de lipídios hepáticos, associada ao aumento da beta-oxidação no fígado e no músculo esquelético no grupo controle (C) (20). Da mesma forma, mulheres saudáveis submetidas ao protocolo HIIT mostraram aumento da oxidação da gordura do corpo e da musculatura esquelética (99).

O PGC1alfa é uma molécula que regula uma variedade de expressões gênicas (100). Os exercícios físicos estimulam a produção de PGC1alfa, especialmente no músculo esquelético, o que é significativo porque o PGC1alfa é secretado na corrente sanguínea e atinge outros tecidos como o TAB (100). O TAB pode expressar PGC1alfa (101) conforme vimos no TAB epididimário e no músculo esquelético de camundongos do nosso estudo. Da mesma forma, em roedores (101) e em humanos, o treinamento de resistência promove aumento da expressão de PGC1alfa no músculo esquelético (102). No fígado de ratos submetidos a um treinamento de resistência (103), ou atividade física voluntária (104), a expressão gênica e a expressão proteica de PGC1alfa foram maiores do que nos animais não-treinados.

O treinamento físico e o PGC1alfa estimulam a produção de FNDC5 no músculo esquelético, que é clivado e secretado como irisina, com efeitos no próprio músculo e no TAB (22, 27). O FNDC5 também pode ser secretado pelo TAB (22) e pelo fígado (23). A irisina pode induzir o fenômeno de *browning* no TAB subcutâneo, com um aumento associado no gasto de energia e perda de MC (27, 105). No fígado, o FNDC5 reduz o acúmulo de lipídeos hepáticos e estimula a oxidação de ácidos graxos (106). A irisina circulante leva a benefícios no metabolismo, sendo inversamente associada à massa de gordura visceral. Portanto, a irisina está ligada à redução do quadro de obesidade e a melhora em relação ao metabolismo da glicose (107).

No presente estudo vimos níveis maiores de FNDC5 no TAB e no músculo esquelético em camundongos treinados (grupos C-HIIT e F-HIIT), o que concorda com os dados de uma intervenção na modalidade de natação em ratos obesos, restaurando os níveis plasmáticos de irisina e aumentando a expressão proteica de FNDC5 no músculo esquelético (108). O treinamento de resistência em ratos obesos estimulou a produção de FNDC5 pelo músculo esquelético (109). Além disso, o aumento nos níveis plasmáticos de irisina proveniente do treinamento físico é associado com a melhora nos níveis de adiposidade e triglicérides (110).

A irisina, juntamente com PGC1a, podem melhorar a expressão PPARalfa (27, 102), o que é relevante por ser o regulador mestre da beta-oxidação, responsável pela transcrição do CPT1. O CPT1 permite a entrada de ácidos graxos nas mitocôndrias e a consequente degradação dos ácidos graxos (111). O HIIT restaurou o PPARalfa e CPT1 no músculo esquelético (111) e no fígado (20) de animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Esses benefícios corroboram com os resultados atuais em um modelo animal experimental alimentado com frutose. Surpreendentemente vimos uma menor expressão gênica de PGC1beta no fígado de animais F-HIIT. PGC1beta é um regulador essencial do metabolismo lipídico relacionado ao aumento da síntese de lipogênese *de novo* e síntese de triglicérides (92). Portanto, o HIIT, não apenas induziu a beta-oxidação, mas também reduziu a lipogênese.

A ativação sustentada da beta-oxidação requer um certo conteúdo primário de mitocôndrias (112). A irisina também esteve associada à indução de biogênese mitocondrial em miócitos C2C12, incluindo os genes PGC1alfa, NRF1 e TFAM (113). Do mesmo modo, o PGC1alfa é responsável pela transcrição dos genes envolvidos na biogênese mitocondrial, como NRF1 e TFAM (101), e a regulação positiva do PPARalfa induz a biogênese mitocondrial (91). NRF1 é o alvo principal do PGC1alfa, envolvido na regulação de outros genes mitocondriais, enquanto o TFAM é necessário para manutenção e replicação do DNA mitocondrial (114).

No presente estudo o protocolo de HIIT promoveu uma melhora nas expressões gênicas de NRF1 e TFAM tanto no TAB como no fígado, mesmo com a continuidade da ingestão de frutose. Em um modelo diferente (camundongos *knockout* para óxido nítrico endotelial), a biogênese mitocondrial e o conteúdo de DNA mitocondrial foram aumentados no TAB após um período de treino em natação (115). Em ratos, o treinamento de resistência ou atividade física voluntária aumentou a biogênese mitocondrial, incluindo a expressão proteica de TFAM (104).

Em resumo, camundongos alimentados com dieta rica em frutose apresentam alterações adversas significativas na MC, na PAS, no metabolismo da glicose, triglicérides no plasma e na esteatose hepática. Estas alterações são associadas à uma expressão reduzida de FNDC5 (irisina) e PGC1alfa e, conseqüentemente, com regulação reduzida de genes relacionados à biogênese mitocondrial e beta-oxidação. O HIIT melhora todos os dados com benefícios para os três órgãos analisados.

6.2 Subprojeto 2

Demonstrou-se nesse estudo que HIIT promove redução do ganho de MC associado ao aumento do gasto energético. Esses efeitos foram relacionados a alterações no TABs que correspondem a uma expressão elevada de marcadores de *browning*, biogênese mitocondrial e genes da beta-oxidação. O impacto aqui relatado do HIIT ultrapassa os efeitos classicamente esperados de uma melhor condição física e metabólica e está associado diretamente ao aumento do gasto de energia e ao remodelamento benéfico do TABs.

A literatura relata que o exercício diminui a expressão gênica lipogênica no tecido adiposo e altera a conformidade celular do adipócito (116). Em humanos com sobrepeso o HIIT colabora com a redução na massa de gordura corporal (117). No entanto, ainda está no debate se o HIIT pode promover mudanças na MC. Embora o presente estudo tenha demonstrado que o HIIT diminuiu o acúmulo de tecido adiposo, uma meta-análise recente em adultos com excesso de peso / obesidade mostrou que o HIIT poderia induzir alterações benéficas na composição da gordura corporal sem alterações na MC (117).

Avaliamos se o protocolo de HIIT poderia induzir o *browning* no TABs mesmo na presença de um ambiente adverso promovido pela dieta rica em frutose. UCP1 é a principal proteína envolvida na termogênese, sendo responsável pela dissipação de energia (118), enquanto PRDM16 mantém o fenótipo “bege” das células adiposas (119). Demonstramos que o HIIT pode aumentar o UCP1 e o PRDM16, que são dois fatores críticos para o acontecimento do *browning*. Consequentemente, em ratos, o treinamento de resistência aumentou a expressão gênica de UCP1 e PRDM16 tanto nos animais controle quanto nos animais obesos (109). Além disso, também observamos uma expressão aumentada de CD137, um marcador de adipócitos bege (26), indicando assim que o HIIT estimulou os preadipócitos bege encontrados na fração vascular estromal do TABs para se transformarem em adipócitos bege maduros (120).

Uma meta-análise recente mostrou que após uma sessão aguda de exercício a concentração de irisina aumenta substancialmente em humanos adultos (121). A irisina, originada da clivagem da FNDC5, induz a expressão de marcadores de *browning*, incluindo UCP1 e consequentemente, aumenta a termogênese nos adipócitos (24). Na atual pesquisa, o HIIT levou a uma expressão aumentada de FNDC5 em concordância com os trabalhos na literatura de que o treinamento de resistência eleva a expressão da proteína FNDC5 em TAB de ratos (109). De importante, com os níveis elevados de CD137 nos adipócitos, a irisina ativa

o processo termogênico induzindo a transcrição de UCP1 de uma maneira dependente de PPARalfa (27, 122).

O PPARgama é responsável pela diferenciação dos adipócitos e os agonistas PPARgama podem induzir o *browning* (123). Pelo contrário, a supressão do PPARgama nas células ósseas promove aumento do *browning* no tecido adiposo associado a uma melhora no metabolismo energético (124). Em nosso estudo, o PPARgama diminuiu nos grupos HIIT, permitindo uma especulação de que o PPARgama não foi essencial para a indução do *browning* e sua redução também foi benéfica ao combater o acúmulo de ácidos graxos no TABs.

As mitocôndrias são essenciais para a termogênese. Avaliamos os marcadores de biogênese mitocondrial, isto é, PGC1alfa, NRF1 e TFAM. O PGC1alfa é um ativador de transcrição crítico que está envolvido na regulação da biogênese mitocondrial e oxidação de ácidos graxos mitocondriais, sendo um dos seus objetivos, o NRF1. Este fator, por sua vez, participa da transcrição de genes envolvidos na biogênese mitocondrial, enquanto o TFAM promove a replicação do DNA mitocondrial (114). Demonstramos que o HIIT aumentou estes três marcadores. Na literatura encontramos relato do treinamento de resistência aumentando PGC1alfa em ratos obesos (109). No TABs de camundongos submetidos a um treinamento de natação, NRF1 e TFAM foram elevados (125).

A beta-oxidação mitocondrial é necessária para a utilização de ácidos graxos termogênicos. PPARalfa tem um papel central no controle da oxidação mitocondrial de ácidos graxos, tendo CPT1a, um dos seus genes alvo, envolvido no transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias (126). Os camundongos da cepa DUhTP (animais com alto desempenho em esteira com mobilização lipídica elevada ao realizar a atividade voluntária) tiveram uma expressão aumentada de PPARalfa no TABs (127). Da mesma forma, uma pessoa ativa apresentou expressão elevada do gene CPT1 no TABs (128). Em nosso estudo, ambos CPT1a e PPARalfa foram aumentados após a exposição ao protocolo de HIIT.

Em resumo, demonstramos que HIIT estimulou o *browning* no TABs em camundongos alimentados com uma dieta rica em frutose, em associação com alterações benéficas na biogênese mitocondrial (expressões de genes PGC1alfa, NRF1 e TFAM) e nos marcadores da beta-oxidação (expressões de genes CPT1 e PPARalfa), contribuindo para uma melhora metabólica num contexto total.

CONCLUSÃO GERAL

Camundongos alimentados com uma dieta rica em frutose apresentam alterações adversas significativas na MC, na PAS, no metabolismo da glicose, em triglicérides no plasma e na esteatose hepática. Estas alterações estão associadas com a expressão reduzida de FNDC5/Irisina e de PGC1alfa. Consequentemente, há uma regulação reduzida de genes relacionados à biogênese mitocondrial e à beta-oxidação. O HIIT melhora todos os indicadores mencionados e beneficia os três órgãos: fígado, TAB e músculo esquelético.

O HIIT também estimula o *browning* no TABs dos animais, em associação com alterações benéficas na biogênese mitocondrial (expressões de genes como PGC1alfa, NRF1 e TFAM) e marcadores de beta-oxidação (expressões de genes como CPT1 e PPARalfa), contribuindo para uma melhora metabólica, pois aumenta o gasto de energia e reduz o ganho de MC.

Se esses achados forem translacionados aos humanos, o HIIT poderia ser considerado um tratamento coadjuvante não farmacológico para pessoas com distúrbios metabólicos associados à síndrome metabólica.

Financiamento

Este estudo contou com o apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) número 302.920 / 2016-1 e FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho do Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro) número E-26 / 201.186 / 2014. Essas agências de financiamento não tiveram papel no projeto do estudo, na coleta de dados, na análise, na decisão de publicação e/ou na elaboração deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Bargut TC, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Fish oil diet modulates epididymal and inguinal adipocyte metabolism in mice. *Food Funct*. 2016;7(3):1468-76.
2. Motta VF, Bargut TL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2017;123(4):699-709.
3. Schultz A, Neil D, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):21873-86.
4. Scully T. Public health: Society at large. *Nature*. 2014;508(7496):S50-1.
5. Bringhenti I, Schultz A, Rachid T, Bomfim MA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. An early fish oil-enriched diet reverses biochemical, liver and adipose tissue alterations in male offspring from maternal protein restriction in mice. *J Nutr Biochem*. 2011;22(11):1009-14.
6. Fraulob JC, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet. *Clin Sci (Lond)*. 2012;123(4):259-70.
7. Souza-Mello V, Gregorio BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119(6):239-50.
8. Lustig RH, Schmidt LA, Brindis CD. Public health: The toxic truth about sugar. *Nature*. 2012;482(7383):27-9.
9. Rippe JM, Angelopoulos TJ. Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: what do we really know? *Adv Nutr*. 2013;4(2):236-45.
10. Rumessen JJ. Fructose and related food carbohydrates. Sources, intake, absorption, and clinical implications. *Scand J Gastroenterol*. 1992;27(10):819-28.
11. Schultz A, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Differences and similarities in hepatic lipogenesis, gluconeogenesis and oxidative imbalance in mice fed diets rich in fructose or sucrose. *Food Funct*. 2015;6(5):1684-91.
12. Karsenty J, Landrier JF, Rousseau-Ralliard D, Robbez-Masson V, Margotat A, Deprez P, et al. Beneficial effects of omega-3 fatty acids on the consequences of a fructose diet are not mediated by PPAR delta or PGC1 alpha. *Eur J Nutr*. 2013;52(8):1865-74.

13. Tappy L, Le KA. Health effects of fructose and fructose-containing caloric sweeteners: where do we stand 10 years after the initial whistle blowings? *Curr Diab Rep.* 2015;15(8):54.
14. Farah D, Nunes J, Sartori M, Dias DD, Sirvente R, Silva MB, et al. Exercise Training Prevents Cardiovascular Derangements Induced by Fructose Overload in Developing Rats. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167291.
15. Stanisic J, Koricanac G, Culafic T, Romic S, Stojiljkovic M, Kostic M, et al. Low intensity exercise prevents disturbances in rat cardiac insulin signaling and endothelial nitric oxide synthase induced by high fructose diet. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;420:97-104.
16. Botezelli JD, Coope A, Ghezzi AC, Cambri LT, Moura LP, Scariot PP, et al. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. *Sci Rep.* 2016;6:31106.
17. Heden TD, Liu Y, Park YM, Winn NC, Kanaley JA. Walking Reduces Postprandial Insulin Secretion in Obese Adolescents Consuming a High-Fructose or High-Glucose Diet. *J Phys Act Health.* 2015;12(8):1153-61.
18. Christensen PM, Jacobs RA, Bonne T, Fluck D, Bangsbo J, Lundby C. A short period of high-intensity interval training improves skeletal muscle mitochondrial function and pulmonary oxygen uptake kinetics. *J Appl Physiol (1985).* 2016;120(11):1319-27.
19. Hussain SR, Macaluso A, Pearson SJ. High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training in the Prevention/Management of Cardiovascular Disease. *Cardiol Rev.* 2016;24(6):273-81.
20. Motta VF, Aguila MB, Mandarim DELCA. High-intensity interval training (swimming) significantly improves the adverse metabolism and comorbidities in diet-induced obese mice. *J Sports Med Phys Fitness.* 2016;56(5):655-63.
21. Indrakusuma I, Sell H, Eckel J. Novel Mediators of Adipose Tissue and Muscle Crosstalk. *Curr Obes Rep.* 2015;4(4):411-7.
22. Rodriguez A, Becerril S, Ezquerro S, Mendez-Gimenez L, Fruhbeck G. Crosstalk between adipokines and myokines in fat browning. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219(2):362-81.
23. Kim HK, Jeong YJ, Song IS, Noh YH, Seo KW, Kim M, et al. Glucocorticoid receptor positively regulates transcription of FNDC5 in the liver. *Sci Rep.* 2017;7:43296.
24. Zhang Y, Xie C, Wang H, Foss RM, Clare M, George EV, et al. Irisin exerts dual effects on browning and adipogenesis of human white adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(2):E530-41.
25. Raciti GA, Spinelli R, Desiderio A, Longo M, Parrillo L, Nigro C, et al. Specific CpG hyper-methylation leads to Ankrd26 gene down-regulation in white adipose tissue of a mouse model of diet-induced obesity. *Sci Rep.* 2017;7:43526.
26. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012;150(2):366-76.

27. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
28. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992-3000.
29. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252-63.
30. Poher AL, Altirriba J, Veyrat-Durebex C, Rohner-Jeanrenaud F. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. *Front Physiol*. 2015;6:4.
31. Hanover LM, White JS. Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am J Clin Nutr*. 1993;58(5 Suppl):724S-32S.
32. Mock K, Lateef S, Benedito VA, Tou JC. High-fructose corn syrup-55 consumption alters hepatic lipid metabolism and promotes triglyceride accumulation. *J Nutr Biochem*. 2017;39:32-9.
33. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev*. 2009;30(1):96-116.
34. Ferder L, Ferder MD, Inserra F. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12(2):105-12.
35. Meigs JB, Wilson PW, Fox CS, Vasan RS, Nathan DM, Sullivan LM, et al. Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):2906-12.
36. Chou CL, Lin H, Chen JS, Fang TC. Renin inhibition improves metabolic syndrome, and reduces angiotensin II levels and oxidative stress in visceral fat tissues in fructose-fed rats. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180712.
37. Aller EE, Abete I, Astrup A, Martinez JA, van Baak MA. Starches, sugars and obesity. *Nutrients*. 2011;3(3):341-69.
38. Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Enikolopov GN, Mintz A, et al. Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation. *Stem Cells Dev*. 2013;22(16):2298-314.
39. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56.
40. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359.

41. Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014;19(1):25-37.
42. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA.* 2003;289(1):76-9.
43. Aarsland A, Chinkes D, Wolfe RR. Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(6):1774-82.
44. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280(5):E745-51.
45. Marette A. Molecular mechanisms of inflammation in obesity-linked insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27 Suppl 3:S46-8.
46. Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnel CJ, Fox CS. Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care.* 2009;32(6):1068-75.
47. Enerback S. The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med.* 2009;360(19):2021-3.
48. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* 2010;285(10):7153-64.
49. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 2007;131(2):242-56.
50. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(2):E444-52.
51. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes.* 2009;58(7):1526-31.
52. Graja A, Schulz TJ. Mechanisms of aging-related impairment of brown adipocyte development and function. *Gerontology.* 2015;61(3):211-7.
53. Busiello RA, Savarese S, Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol.* 2015;6:36.
54. Gospodarska E, Nowialis P, Kozak LP. Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue. *J Biol Chem.* 2015;290(13):8243-55.
55. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol.* 2013;15(6):659-67.

56. Bernardo B, Lu M, Bandyopadhyay G, Li P, Zhou Y, Huang J, et al. FGF21 does not require interscapular brown adipose tissue and improves liver metabolic profile in animal models of obesity and insulin-resistance. *Sci Rep.* 2015;5:11382.
57. Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Guertin DA. Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends Cell Biol.* 2016;26(5):313-26.
58. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA, Network NCR. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology.* 2011;53(3):810-20.
59. Aguila MB, Santos CF, Pinheiro-Mulder AR, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. Hepatic insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. In: Molière J, Gauthier L, editors. *Insulin resistance: symptoms, causes and treatment.* Hauppauge, NY: Nova Science Pu.; 2010. p. 1-44.
60. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15080.
61. Ekstedt M, Hagstrom H, Nasr P, Fredrikson M, Stal P, Kechagias S, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology.* 2015;61(5):1547-54.
62. Torres DM, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease: Fibrosis portends a worse prognosis. *Hepatology.* 2015;61(5):1462-4.
63. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition.* 2010;26(11-12):1044-9.
64. Tappy L, Le KA. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 2010;90(1):23-46.
65. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(5):251-64.
66. Wiernsperger N, Geloën A, Rapin JR. Fructose and cardiometabolic disorders: the controversy will, and must, continue. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(7):729-38.
67. Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem.* 2012;23(3):203-8.
68. Gibala MJ. High-intensity interval training: a time-efficient strategy for health promotion? *Curr Sports Med Rep.* 2007;6(4):211-3.
69. Tabata I, Nishimura K, Kouzaki M, Hirai Y, Ogita F, Miyachi M, et al. Effects of moderate-intensity endurance and high-intensity intermittent training on anaerobic capacity and VO₂max. *Med Sci Sports Exerc.* 1996;28(10):1327-30.

70. Milanovic Z, Sporis G, Weston M. Effectiveness of High-Intensity Interval Training (HIT) and Continuous Endurance Training for VO₂max Improvements: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Trials. *Sports Med.* 2015;45(10):1469-81.
71. Costigan SA, Eather N, Plotnikoff RC, Taaffe DR, Lubans DR. High-intensity interval training for improving health-related fitness in adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2015;49(19):1253-61.
72. Ramos JS, Dalleck LC, Tjonna AE, Beetham KS, Coombes JS. The impact of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on vascular function: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 2015;45(5):679-92.
73. Liou K, Ho S, Fildes J, Ooi SY. High Intensity Interval versus Moderate Intensity Continuous Training in Patients with Coronary Artery Disease: A Meta-analysis of Physiological and Clinical Parameters. *Heart Lung Circ.* 2016;25(2):166-74.
74. Weston KS, Wisloff U, Coombes JS. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2014;48(16):1227-34.
75. Jolleyman C, Yates T, O'Donovan G, Gray LJ, King JA, Khunti K, et al. The effects of high-intensity interval training on glucose regulation and insulin resistance: a meta-analysis. *Obes Rev.* 2015;16(11):942-61.
76. Trapp EG, Chisholm DJ, Freund J, Boutcher SH. The effects of high-intensity intermittent exercise training on fat loss and fasting insulin levels of young women. *Int J Obes (Lond).* 2008;32(4):684-91.
77. Moreau D, Kirk IJ, Waldie KE. High-intensity training enhances executive function in children in a randomized, placebo-controlled trial. *Elife.* 2017;6.
78. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51.
79. Norton K, Norton L, Sadgrove D. Position statement on physical activity and exercise intensity terminology. *J Sci Med Sport.* 2010;13(5):496-502.
80. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, et al. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32(9 Suppl):S498-504.
81. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.
82. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(7):2402-10.

83. Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch.* 2011;459(5):477-85.
84. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc.* 2011;243(1):47-59.
85. Aguila MB, Pinheiro AR, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int.* 2003;23(5):363-70.
86. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias.* 2003;75(4):469-86.
87. Mandarim-de-Lacerda CA, Del Sol M. Tips for studies with quantitative morphology (morphometry and stereology). *Int J Morphol.* 2017;35(4):1482-94.
88. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22.
89. Charrez B, Qiao L, Hebbard L. The role of fructose in metabolism and cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015;22(2):79-89.
90. Magliano DC, Penna-de-Carvalho A, Vazquez-Carrera M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Short-term administration of GW501516 improves inflammatory state in white adipose tissue and liver damage in high-fructose-fed mice through modulation of the renin-angiotensin system. *Endocrine.* 2015;50(2):355-67.
91. Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(5):E1180-90.
92. Nagai Y, Yonemitsu S, Erion DM, Iwasaki T, Stark R, Weismann D, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 2009;9(3):252-64.
93. Warren BE, Lou PH, Lucchinetti E, Zhang L, Clanachan AS, Affolter A, et al. Early mitochondrial dysfunction in glycolytic muscle, but not oxidative muscle, of the fructose-fed insulin-resistant rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(6):E658-67.
94. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, et al. Increased skeletal muscle mitochondrial efficiency in rats with fructose-induced alteration in glucose tolerance. *Br J Nutr.* 2013;110(11):1996-2003.
95. Jaiswal N, Maurya CK, Arha D, Avisetti DR, Prathapan A, Raj PS, et al. Fructose induces mitochondrial dysfunction and triggers apoptosis in skeletal muscle cells by provoking oxidative stress. *Apoptosis.* 2015;20(7):930-47.
96. Conti FF, Brito Jde O, Bernardes N, Dias Dda S, Malfitano C, Morris M, et al. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and

- menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309(12):R1532-9.
97. Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Toxicol Pathol*. 2012;64(4):273-82.
98. Karise I, Ornellas F, da Silva SB, Matsuura C, Del Sol M, Aguila MB, et al. Liver and Metformin: lessons of a fructose diet in mice. *Biochimie Open*. 2017;4:19-30.
99. Talanian JL, Galloway SD, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. *J Appl Physiol* (1985). 2007;102(4):1439-47.
100. Sanchez-Delgado G, Martinez-Tellez B, Olza J, Aguilera CM, Gil A, Ruiz JR. Role of Exercise in the Activation of Brown Adipose Tissue. *Ann Nutr Metab*. 2015;67(1):21-32.
101. Sutherland LN, Bomhof MR, Capozzi LC, Basaraba SA, Wright DC. Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue. *J Physiol*. 2009;587(Pt 7):1607-17.
102. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, et al. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*. 2003;52(12):2874-81.
103. Fletcher JA, Meers GM, Linden MA, Kearney ML, Morris EM, Thyfault JP, et al. Impact of various exercise modalities on hepatic mitochondrial function. *Med Sci Sports Exerc*. 2014;46(6):1089-97.
104. Santos-Alves E, Marques-Aleixo I, Rizo-Roca D, Torrella JR, Oliveira PJ, Magalhaes J, et al. Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling. *Life Sci*. 2015;135:124-30.
105. Rodriguez A, Becerril S, Mendez-Gimenez L, Ramirez B, Sainz N, Catalan V, et al. Leptin administration activates irisin-induced myogenesis via nitric oxide-dependent mechanisms, but reduces its effect on subcutaneous fat browning in mice. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(3):397-407.
106. Liu TY, Xiong XQ, Ren XS, Zhao MX, Shi CX, Wang JJ, et al. FNDC5 Alleviates Hepatosteatosis by Restoring AMPK/mTOR-Mediated Autophagy, Fatty Acid Oxidation, and Lipogenesis in Mice. *Diabetes*. 2016;65(11):3262-75.
107. Hwang YC, Jeon WS, Park CY, Youn BS. The ratio of skeletal muscle mass to visceral fat area is a main determinant linking circulating irisin to metabolic phenotype. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:9.
108. Yang XQ, Yuan H, Li J, Fan JJ, Jia SH, Kou XJ, et al. Swimming intervention mitigates HFD-induced obesity of rats through PGC-1 α -irisin pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(10):2123-30.

109. Rocha-Rodrigues S, Rodriguez A, Gouveia AM, Goncalves IO, Becerril S, Ramirez B, et al. Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. *Life Sci.* 2016;165:100-8.
110. Lu Y, Li H, Shen SW, Shen ZH, Xu M, Yang CJ, et al. Swimming exercise increases serum irisin level and reduces body fat mass in high-fat-diet fed Wistar rats. *Lipids Health Dis.* 2016;15:93.
111. Cho JK, Kim S, Hong HR, Yoon JH, Kang H. Exercise Training Improves Whole Body Insulin Resistance via Adiponectin Receptor 1. *Int J Sports Med.* 2015.
112. Bijland S, Mancini SJ, Salt IP. Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin Sci (Lond).* 2013;124(8):491-507.
113. Vaughan RA, Gannon NP, Barberena MA, Garcia-Smith R, Bisoffi M, Mermier CM, et al. Characterization of the metabolic effects of irisin on skeletal muscle in vitro. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16(8):711-8.
114. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 2004;18(4):357-68.
115. Trevellin E, Scorzeto M, Olivieri M, Granzotto M, Valerio A, Tedesco L, et al. Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes.* 2014;63(8):2800-11.
116. Giles ED, Steig AJ, Jackman MR, Higgins JA, Johnson GC, Lindstrom RC, et al. Exercise Decreases Lipogenic Gene Expression in Adipose Tissue and Alters Adipocyte Cellularity during Weight Regain After Weight Loss. *Front Physiol.* 2016;7:32.
117. Wewege M, van den Berg R, Ward RE, Keech A. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2017;18(6):635-46.
118. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell reports.* 2013;5(5):1196-203.
119. Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T, et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab.* 2014;19(4):593-604.
120. Spiegelman BM. Banting Lecture 2012: Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes.* 2013;62(6):1774-82.
121. Fox J, Rioux BV, Goulet EDB, Johanssen NM, Swift DL, Bouchard DR, et al. Effect of an acute exercise bout on immediate post-exercise irisin concentration in adults: A meta-analysis. *Scand J Med Sci Sports.* 2017.

122. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Fenofibrate (PPARalpha agonist) induces beige cell formation in subcutaneous white adipose tissue from diet-induced male obese mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;402:86-94.
123. Jeremic N, Chaturvedi P, Tyagi SC. Browning of White Fat: Novel Insight Into Factors, Mechanisms, and Therapeutics. *J Cell Physiol.* 2017;232(1):61-8.
124. Brun J, Berthou F, Trajkovski M, Maechler P, Foti M, Bonnet N. Bone Regulates Browning and Energy Metabolism Through Mature Osteoblast/Osteocyte PPARgamma Expression. *Diabetes.* 2017;66(10):2541-54.
125. Chung N, Park J, Lim K. The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue. *J Exerc Nutrition Biochem.* 2017;21(2):39-47.
126. Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPARalpha. *Mol Metab.* 2014;3(4):354-71.
127. Brenmoehl J, Ohde D, Albrecht E, Walz C, Tuchscherer A, Hoeflich A. Browning of subcutaneous fat and higher surface temperature in response to phenotype selection for advanced endurance exercise performance in male DUhTP mice. *J Comp Physiol B.* 2017;187(2):361-73.
128. Pino MF, Parsons SA, Smith SR, Sparks LM. Active individuals have high mitochondrial content and oxidative markers in their abdominal subcutaneous adipose tissue. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24(12):2467-70.

APENDICE – Artigo aceito – Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, White adipose tissue and skeletal muscle

J Appl Physiol 123: 699–709, 2017.

First published May 11, 2017; doi:10.1152/jappphysiol.00154.2017.

RESEARCH ARTICLE

Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle

Victor F. Motta, Thereza L. Bargut, Marcia B. Aguilu, and Carlos A. Mandarim-de-Lacerda

Laboratory of Morphometry, Metabolism, and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Submitted 16 February 2017; accepted in final form 4 May 2017

Motta VF, Bargut TL, Aguilu MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 123: 699–709, 2017. First published May 11, 2017; doi:10.1152/jappphysiol.00154.2017.— Fructose-rich caloric sweeteners induce adverse changes in the metabolism of humans. The study evaluated the effects of high-intensity interval training (HIIT) on a fructose feeding model, focusing on the liver, white adipose tissue (WAT), skeletal muscle, and their interplay. Male C57BL/6 mice were fed for 18 wk one of the following diets: control (C; 5% of total energy from fructose) or fructose (F; 55% of total energy from fructose). In the 10th week, for an additional 8-wk period, the groups were divided into nontrained (NT) or HIIT groups, totaling four groups: C-NT, C-HIIT, F-NT, and F-HIIT. At the end of the experiment, fructose consumption in the F-NT group led to a high systolic blood pressure, high plasma triglycerides, insulin resistance with glucose intolerance, and lower insulin sensitivity. We also observed liver steatosis, adipocyte hypertrophy, and diminished gene expressions of peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1- α and fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5; irisin) in this F-NT group. These results were accompanied by decreased gene expressions of nuclear respiratory factor 1 and mitochondrial transcription factor A (markers of mitochondrial biogenesis), and peroxisome proliferator-activated receptor- α and carnitine palmitoyltransferase 1 (markers of β -oxidation). HIIT improved all of these data in the C-HIIT and F-HIIT groups. In conclusion, in mice fed a fructose diet, HIIT improved body mass, blood pressure, glucose metabolism, and plasma triglycerides. Liver, WAT, and skeletal muscle were positively modulated by HIIT, indicating HIIT as a coadjutant treatment for diseases affecting these tissues.

NEW & NOTEWORTHY We investigated the effects of high-intensity interval training (HIIT) in mice fed a fructose-rich diet and the resulting severe negative effect on the liver, white adipose tissue (WAT), and skeletal muscle, which reduced the expression of fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5, irisin) and PGC1 α and, consequently, affected markers of mitochondrial biogenesis and β -oxidation. Because HIIT may block these adverse effects in all of these three tissues, it might be suggested that it functions as a coadjutant treatment in combatting the alterations caused by high-fructose intake.

fructose; high-intensity interval training; liver; white adipose tissue; skeletal muscle

FRUCTOSE is a monosaccharide present in small quantities in fruits and honey and is used industrially to sweeten drinks and sodas (6). However, the consumption of fructose causes high blood pressure and worsens insulin resistance, hepatic steatosis, among other comorbidities (14, 27), even without modifying the body adiposity (45).

The exercise training showed beneficial effects in the fructose-induced adverse changes in rodents, such as raised blood pressure and alterations in the oxidative stress profile (15), which prevented alterations of insulin signaling, endothelial nitric oxide synthesis (46), and inflammation (5). Likewise, walking was efficient in diminishing the postprandial insulin secretion in humans consuming a high-fructose diet (17).

In the fructose-induced adversities, the beneficial effects of exercise training were seen when low- (46) or moderate-intensity training (15) was applied, but little is known about the consequences of the high-intensity interval training (HIIT, high-intensity exercise periods combined with short rest intervals). HIIT is more and more considered as a possible replacement for traditional aerobic exercise (11), because of the diminished amount of time required for the activity and the combination of aerobic and anaerobic stimuli (18).

Although most studies have focused on the cardiovascular effects of exercise (15, 46), the liver, white adipose tissue (WAT), and skeletal muscle are also natural targets of exercise training (5, 33). WAT and skeletal muscle have a biological crosstalk that occurs in an endocrine way through the secretion of adipokines (WAT) and myokines (muscle). Common mediators that are released by both tissues called adipomyokines have had an increased significance in the literature (20), including irisin (derived from the cleavage of FNDC5, fibronectin type III domain-containing 5 protein, which increases energy expenditure) (39). Recently, the mRNA expression of FNDC5 was identified in the liver (26), and the serum irisin concentrations have been found to be inversely correlated with liver lipid accumulation (54). Therefore, it is worthy to note that these mediators, including irisin, can be modulated by both obesity and exercise (20).

Taking the data into consideration, we were naturally encouraged to investigate the effects of HIIT in a model of mice fed high fructose. We hypothesized that HIIT might benefit the liver, WAT, and skeletal muscle against the fructose-induced adverse effects. Therefore, the current study was undertaken to assess the effects of HIIT on the liver, WAT, and skeletal muscle in a high-fructose diet model of metabolic alterations.

Address for reprint requests and other correspondence: C. A. Mandarim-de-Lacerda, State University of Rio de Janeiro, Av 28 de Setembro 87 fds, Rio de Janeiro, Brazil (e-mail: mandarim@uerj.br).

<http://www.jappphysiol.org>

8750-7587/17 Copyright © 2017 the American Physiological Society

699

Entrada x

26/11/2017

Obesity Research and Clinical Practice <eesserver@eesmail.elsevier.com>
para mim

inglês > português Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Dear Dr. Victor Motta,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Obesity Research & Clinical Practice
Corresponding Author: Carlos Mandarim-de-Lacerda
Co-Authors: Victor F Motta, PhD; Thereza L Bargut, RD, PhD; Vanessa Souza-Mello, RD, PhD; Marcia B Aguilu, RD, PhD;
Title: High-intensity interval training may induce browning in the subcutaneous white adipose tissue of mice

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at mandarim@ueerj.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:
<https://ees.elsevier.com/orcp/l.asp?i=73394&l=U7DFK4H3>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.orcid.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Obesity Research & Clinical Practice

ANEXO B - Aprovação pelo Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada “Exercício aeróbio versus exercício de alta intensidade em camundongos alimentados com dieta rica em frutose”, registrada com o nº 12/2014, sob a responsabilidade de **Carlos Alberto Mandarim de Lacerda** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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, do Decreto nº 6.899, 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 28/07/2014.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/07/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongos C57BL/6
No. de animais	60
Peso/idade	0,25/90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 28 de julho de 2014.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ