



Exercício físico e obesidade. Efeito da atividade física voluntária e do treino de endurance na funcionalidade de mitocôndrias do tecido adiposo.

Dissertação apresentada com vista à obtenção do 2º ciclo em Atividade Física e Saúde, da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto ao abrigo do Decreto de Lei nº.74/2006 de 24 de Março

Orientadores: Prof. Doutor José Magalhães e Prof. Doutor António Ascensão

Autor: Jorge Manuel Sousa Beleza

Porto, Setembro de 2014

Ficha de catalogação

Beleza, J. (2014). *Exercício físico e obesidade. Efeito da atividade física voluntária e do treino de endurance na funcionalidade de mitocôndrias do tecido adiposo*. Porto: Beleza, J. Dissertação de Mestrado em Atividade Física e Saúde apresentada à Faculdade de Deporto da Universidade do Porto.

Palavras-Chave: EXERCÍCIO FÍSICO, OBESIDADE, TECIDO ADIPOSEO VISCERAL, FUNÇÃO E BIOGÉNESE MITOCONDRIAL.

Este trabalho foi elaborado no âmbito do projeto PTDC/DES/113580/2009-FCT/FCOMP-01-0124 FEDER-009573 financiado pela Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia e com o apoio do Centro de Investigação em Atividade Física Saúde e Lazer Unidade I&D (Pest OE/SAU/UI0617/2011).



Aos meus avós.

Agradecimentos

Agora que finalizo esta empolgante e árdua jornada, gostaria de agradecer às pessoas que me apoiaram durante todo o processo e sem as quais não teria sido possível concretizar este meu objetivo. Por tudo isto agradeço:

Aos meus orientadores, Prof. Doutor José Magalhães e Prof. Doutor António Ascensão por me terem aberto a porta do Laboratório de Biologia do Desporto, e por me possibilitarem a realização desta tese. Gostava de agradecer também toda a partilha de conhecimento, compreensão e disponibilidade que sempre demonstraram.

À Sílvia Rodrigues pela disponibilidade que sempre demonstraste, desde o primeiro dia. Por me teres permitido acompanhar o teu doutoramento. Por toda a ajuda e paciência ao longo deste processo de escrita da tese.

A toda a equipa do laboratório, Estela Alves, Inês Aleixo, Inês Gonçalves Emanuel Passos, pelo apoio durante a realização do trabalho experimental.

Ao Centro de Investigação em Atividade Física, Saúde e Lazer (CIAFEL) por todo o apoio e colaboração prestados na realização deste estudo.

Aos meus colegas de mestrado por terem partilhado comigo o entusiasmo e as angústias de todo este processo, em especial ao Marcelo, à Patrícia, à Joana, à Teresa e à Sara.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo o apoio que me têm dado ao longo da vida, mas principalmente pelo amor que me dão todos os dias.

À Fabiana pelo apoio incondicional, por todo o carinho e amor, e por todos aqueles momentos em que não pude estar disponível.

Índice Geral

Índice Geral.....	IX
Índice de figuras.....	X
Índice de Tabelas.....	X
Resumo	XI
Abstract.....	XIII
Abreviaturas e símbolos.....	XV
1. Introdução.....	1
2. Revisão da literatura	3
2.1. Tecido adiposo.....	3
2.1.1. Tecido adiposo castanho vs. tecido adiposo branco	4
2.1.2. Tecido adiposo subcutâneo vs. tecido adiposo visceral.....	6
2.2. Obesidade.....	7
2.2.1. Alterações dinâmicas da composição do tecido adiposo visceral ..	8
2.2.2. Disfunção mitocondrial do tecido adiposo visceral.....	11
2.3. O exercício físico como estratégia preventiva e terapêutica contra as alterações no tecido adiposo visceral induzidas pela obesidade	15
2.3.1. Exercício físico	16
3. Objetivos.....	21
3.1. Objetivo geral	21
4. Metodologia	23
4.1. Caracterização da amostra	23
4.2. Programas de exercício	24
4.3. Medições anatômicas e recolha de tecidos	25
4.4. Western blotting	26
4.5. Procedimentos estatísticos	27
5. Resultados.....	29
6. Discussão dos Resultados.....	35
7. Conclusões.....	41
8. Referências bibliográficas	43

Índice de figuras

Figura 1: Desenho experimental	24
Figura 2: Dieta ingerida (A) e distância percorrida em tapete rolante (ET) e na roda livre (VPA) (B) por semana.	31
Figura 3: Efeito da dieta, atividade física voluntária e do treino aeróbio no conteúdo proteico das subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons.	32
Figura 4: Efeito da dieta e do exercício no conteúdo proteico de ANT, PGC-1 α , TFAM e SIRT3.	33

Índice de Tabelas

Tabela 1: Efeito da dieta, atividade física voluntária e treino de endurance nos indicadores anatômicos: peso corporal; índice de adiposidade visceral; índice de massa corporal; rácio baço/peso corporal; rácio coração/ peso corporal; atividade citrato sintase no músculo solear	30
---	----

Resumo

A obesidade atingiu proporções epidémicas e em conjunto com as doenças associadas tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. O tecido adiposo visceral (VAT) tem sido reconhecido como um dos principais intervenientes no controlo dos processos patológicos associados à obesidade. A expansão excessiva do VAT parece estar associada a complicações ao nível mitocondrial, podendo levar à disfunção mitocondrial no próprio tecido. O objetivo do nosso estudo foi analisar o efeito da atividade física voluntária (VPA) e do treino de endurance (ET) realizado em tapete rolante em biomarcadores de função e biogénese mitocondrial do VAT em ratos submetidos a uma dieta rica em gordura (HFD).

Foram utilizados 36 ratos *Sprague-Dawley*-macho com 6 semanas de idade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos: dieta *standard* sedentário (SS, n=6); dieta *standard* e VPA (SVPA, n=5); dieta *standard* e ET (ST, n=6); HFD sedentário (HS, n=6); HFD e VPA (HVPA, n=6); HFD e ET (HT, n=7). Os animais dos grupos SVPA e HVPA tiveram acesso à roda livre durante as 17 semanas do protocolo e os grupos ST e HT iniciaram o programa de exercício após 9 semanas, enquanto mantiveram o protocolo das dietas. O depósito de gordura epididimal foi excisado e utilizado para determinar a expressão proteica de subunidades do sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS), factor de transcrição mitocondrial A (TFAM), co-ativador 1-alfa do recetor ativado pelo proliferador de peroxissoma gama (PGC1- α), translocador de nucleótidos de adenina (ANT), e Sirtuína 3 (SIRT3).

Os animais submetidos à HFD exibiram uma diminuição da expressão proteica das subunidades do complexo IV e V, de PGC1- α e de TFAM. A VPA crónica não induziu alterações significativas nas subunidades da ETC. O programa de ET aumentou os níveis proteicos do complexo IV nos animais sujeitos aos dois tipos de dieta, e do complexo V, apenas nos animais sujeitos à dieta *standard*. A dieta, VPA e o ET não induziram alterações significativas nos níveis proteicos de ANT. Não verificamos alterações significativas no conteúdo proteico de

PGC1- α e de TFAM após 17 semanas de VPA. O ET reverteu a diminuição induzida pela HFD na expressão proteica de PGC-1 α e TFAM. A dieta e a VPA não induziram alterações significativas no conteúdo proteico de SIRT3. O ET promoveu uma diminuição do conteúdo proteico de SIRT3, nos animais sujeito a uma HFD.

Os resultados do nosso estudo sugerem que o consumo de uma HFD pode levar a um comprometimento da função e da biogénese mitocondrial. Contrariamente à hipótese inicial, a VPA não demonstrou um efeito preventivo contra os efeitos deletérios associados a uma HFD. O ET parece induzir um aumento da função e da biogénese mitocondrial no tecido adiposo visceral de animais submetidos a uma HFD.

Palavras-Chave: EXERCÍCIO FÍSICO, OBESIDADE, TECIDO ADIPOSEO VISCERAL, FUNÇÃO E BIOGÉNESE MITOCONDRIAL.

Abstract

Nowadays, obesity has reached epidemic proportions and together with the associated diseases became one of the biggest public health problems. Visceral adipose tissue (VAT) has been recognized as a key player in the control of disease processes associated with obesity. Excessive expansion of VAT seems to be associated with complications at the mitochondrial level, which may lead to mitochondrial dysfunction in tissue itself. The aim of our study was to analyze the effect of voluntary physical activity (VPA) and endurance training (ET) performed on a treadmill on biomarkers of mitochondrial function and biogenesis on VAT of the rats submitted to a high fat diet (HFD).

36 Sprague-Dawley male 6 weeks-old were used. The animals were randomly assigned into 6 groups: sedentary standard diet (SD, n = 6); standard diet and VPA (SVPA, n = 5); standard diet and ET (ST, n = 6); Sedentary HFD (HS, n = 6); HFD and VPA (HVPA, n = 6); HFD and ET (HT, n = 7). The animals of groups SVPA and HVPA had access to freewheel during the 17 weeks of the protocol, the ST and HT groups started the exercise program after 9 weeks, while maintained the protocol diets. The epididymal fat deposit was excised and used to determine the protein expression of subunits of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), mitochondrial transcription factor A (TFAM), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1- α), adenine nucleotide translocator (ANT) and sirtuin 3 (SIRT3).

The animals submitted to HFD showed a decrease in protein expression of the subunits of complex IV and V, PGC1- α and TFAM. Chronic VPA did not induce significant changes in the subunits of the ETC. The program of ET increased the protein levels of the complex IV in animals subjected to both diets, and the V complex, only in animals subjected to the standard diet. Diet, VPA and ET did not induce significant changes in protein levels of ANT. We didn't verified significant changes in protein content of PGC1- α and TFAM after 17 weeks of VPA. ET reversed the protein expression of PGC-1 α and TFAM decrease induced by HFD. Diet and VPA did not induce significant changes in protein

content of SIRT3. ET promoted a reduction in the protein content of SIRT3 in animals subjected to a HFD.

The results of our study suggest that consumption of a HFD may lead to an impairment of mitochondrial function and biogenesis. In contrast to the initial hypothesis, the VPA did not showed a preventive effect against the deleterious effects associated with an HFD. ET seems to induce an increase in mitochondrial function and biogenesis in the VPA in animals subjected to a HFD.

Keywords: EXERCISE, OBESITY, VISCERAL ADIPOSE TISSUE, FUNCTION AND MITOCHONDRIAL BIOGENESIS.

Abreviaturas e símbolos

ADP	do inglês, <i>adenosine diphosphate</i>
ATP	do inglês, <i>adenosine triphosphate</i>
BAT	do inglês, <i>brown adipose tissue</i>
C/EBP α	do inglês, <i>cAMP responsive element-binding protein alpha</i>
CETP	do inglês, <i>cholesteryl ester transfer protein</i>
DNA	do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
ET	do inglês, <i>endurance training</i>
FAs	do inglês, <i>fatty acids</i>
FABP4	do inglês, <i>fatty acid-binding protein 4</i>
FADH2	do ingles, <i>flavin adenine dinucleotide</i>
FFAs	do inglês, <i>free fatty acids</i>
GLUT1	do inglês, <i>glucose transporter 1</i>
HSL	do inglês, <i>hormone sensitive lipase</i>
ICAM-1	do inglês, <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IDH2	do inglês, <i>isocitrate dehydrogenase 2</i>
IGFBP-3	do inglês, <i>insulin-like growth factor-binding protein 3</i>
IGF-1	do inglês, <i>insulin-like growth factor 1</i>
IL-6	do inglês, <i>interleukyn 6</i>
IL-10	do inglês, <i>interleukyn 10</i>
JNK	do inglês, <i>C-Jun N- terminal kinase</i>
MCP-1	do inglês, <i>monocyte chemotactic protein-1</i>

Mfn2	do inglês, <i>mitofusin 2</i>
NADH	do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
NEFA	do inglês, <i>non-sterified fatty acids</i>
NF- κ B	do inglês, <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell</i>
OXPHOS	do inglês, <i>oxidative phosphorylation</i>
PAI-1	do inglês, <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PPAR γ	do inglês, <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PGC-1 α	do inglês, <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha</i>
ROS	do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
SOD	do inglês, <i>superoxide dismutase</i>
TNF- α	do inglês, <i>tumor necrosis factor alfa</i>
TFAM	do inglês, <i>mitochondrial transcription factor A</i>
TLR-4	do inglês, <i>toll-like receptor-4</i>
UCP1	do inglês, <i>uncoupling protein 1</i>
VAT	do inglês, <i>visceral adipose tissue</i>
VPA	do inglês, <i>voluntary physical activity</i>

1. Introdução

A obesidade pode ser considerada, de uma forma geral, como o resultado de um balanço energético positivo em condições de excesso de energia, caracterizadas por uma abundância de alimentos ricos em calorias e baixa atividade física (Balistreri et al., 2010). Este desequilíbrio crónico de calorias consumidas *versus* despendidas causa um aumento de energia acumulada nos adipócitos sobre a forma de gordura (Chang et al., 2012). De entre os diferentes tipos de gordura, o do tecido adiposo visceral (VAT, do inglês, *visceral adipose tissue*) tem sido o alvo de maior interesse e estudo na literatura, devido ao papel altamente dinâmico que desempenha na modulação de diversos processos fisiológicos, incluindo o metabolismo lipídico, a homeostasia da glucose, inflamação, imunidade, angiogénese, hemóstase e pressão sanguínea (Hajer et al., 2008b). O excesso de acumulação de gordura visceral tem sido associado a inúmeras doenças crónicas, atingindo proporções epidémicas e tornando-se num dos maiores problemas de saúde pública da atualidade (WHO, 2013).

A mitocôndria é um organelo celular que desempenha funções importantes nos processos fisiológicos da generalidade dos tecidos e a sua disfunção tem sido associada ao desenvolvimento de diversas doenças crónicas (Duchen, 2004). No VAT, a mitocôndria desempenha um papel importante, entre outros aspetos, na diferenciação e maturação dos adipócitos (Wilson-Fritch et al., 2003) no metabolismo energético (Cho et al., 2009; Patti & Corvera, 2010), e na manutenção do estado redox (Carriere et al., 2004). Contudo, tem sido descrito que a expansão excessiva do VAT, característico de uma situação de obesidade, leva à disfunção mitocondrial, caracterizada pela diminuição do conteúdo mitocondrial (Choo et al., 2006; Wilson-Fritch et al., 2004), pelo declínio do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, deoxyribonucleic acid) mitocondrial (Koh et al., 2007), pela desregulação da expressão de genes nucleares que codificam para subunidades da cadeia transportadora de eletrões (ETC, do inglês, *electron transport chain*) (Dahlman et al., 2006) e co-ativador 1-alfa do recetor ativado pelo proliferador de

peroxissoma gama (PGC-1 α , do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha*) (Semple et al., 2004), e pela diminuição do consumo de oxigênio (Koh et al., 2007).

De entre as várias estratégias utilizadas para combater a obesidade, a modificação dos estilos de vida com foco na atividade física, tem sido considerada como a primeira linha de tratamento contra a obesidade (Goncalves, Passos, Rocha-Rodrigues, Torrella, et al., 2014) e tem apresentado resultados positivos no combate de diversas patologias relacionadas com a obesidade, como a resistência periférica à insulina, dislipidemias e diabetes mellitus tipo II (Pedersen & Saltin, 2006). Contudo, o efeito da atividade física na disfunção mitocondrial do VAT promovida por uma dieta rica em gordura (HFD, do inglês, *high-fat diet*), tem sido pouco estudado. Assim, o objetivo do nosso trabalho foi analisar o efeito da atividade física voluntária (VPA, do inglês, *voluntary physical activity*) e do treino de endurance (ET, do inglês, *endurance training*) realizado em tapete rolante em biomarcadores de função e biogénese mitocondrial do VAT em ratos submetidos a uma HFD.

A hipótese avançada é de que a VPA previne os efeitos deletérios associados a uma HFD, enquanto que o ET atua como terapêutica no combate a esses mesmo efeitos deletérios, na função e biogénese mitocondrial, do VAT.

2. Revisão da literatura

2.1. Tecido adiposo

Durante várias décadas, o tecido adiposo foi considerado como um local de armazenamento de energia proporcionando também proteção mecânica e isolamento térmico ao organismo (Hajer et al., 2008a; Rosen & MacDougald, 2006). Porém, nos últimos 20 anos, após a descoberta da leptina, os investigadores tomaram crescente consciência de que os adipócitos poderiam também ser reguladores essenciais da homeostasia corporal (Rosen & MacDougald, 2006). De facto, o tecido adiposo apresenta um papel altamente dinâmico associado à modulação de diversos processos fisiológicos, incluindo o metabolismo lipídico, a homeostasia da glucose, inflamação, imunidade, angiogénese, hemóstase (regulação da coagulação sanguínea) e pressão sanguínea (Hajer et al., 2008b). Este pleiotropismo funcional assenta na sua capacidade de sintetizar e, em alguns casos, secretar uma grande quantidade de hormonas, fatores de crescimento, fatores complementares, enzimas, proteínas da matriz e de membrana, coletivamente designadas por adipocinas. Concomitantemente, o tecido adiposo expressa recetores para a maioria desses fatores assegurando um *cross-talk* a nível local e sistémico em resposta às alterações metabólicas induzidas por diferentes estímulos (Ibrahim, 2010).

À semelhança dos restantes mamíferos, o Homem apresenta duas variedades de tecido adiposo. O tecido adiposo castanho e o tecido adiposo branco distinguem-se a nível morfológico, fisiológico, molecular e funcional (Cinti, 2006). Em 2005, Cinti S. estabeleceu uma nova perspetiva ao considerar que todos os depósitos adiposos teriam adipócitos brancos e castanhos definindo, desta forma, o conceito dinâmico do órgão adiposo. Assim, o tecido adiposo castanho e o tecido adiposo branco parecem representar tecidos onde predominam os adipócitos castanhos e brancos (Cinti, 2005).

2.1.1. Tecido adiposo castanho vs. tecido adiposo branco

Tecido adiposo castanho

O tecido adiposo castanho encontra-se em maior abundância nas regiões supraclavicular, cervical e para-vertebral (nos humanos) e na região interescapular (em ratos) (Rosen & Spiegelman, 2000). Este tecido possui adipócitos de cor acastanhada devido à elevada vascularização e densidade mitocondrial, rica em citocromos e inúmeras gotículas lipídicas (multilocular) dispersas pelo citoplasma (Ibrahim, 2010). Este tecido é altamente especializado em dissipar a energia química sob a forma de calor devido à presença de proteínas de desacoplamento nas membranas mitocondriais. A proteína desacopladora 1 (UCP1, do inglês, *uncoupling protein 1*) é especificamente expressa nos adipócitos castanhos e catalisa a “fuga” de elétrons através da membrana mitocondrial. Deste modo, implementa a produção de calor e provoca o desacoplamento da fosforilação oxidativa comprometendo a produção de ATP (ATP, do inglês, *adenosine triphosphate*) (Cannon & Nedergaard, 2004; Fernandez-Sanchez et al., 2011). Tradicionalmente era reconhecido que este processo termogénico era de importância vital apenas nos recém-nascidos quando expostos ao frio, no entanto, mais recentemente, foi também descoberta a existência de uma quantidade considerável de tecido adiposo castanho metabolicamente ativo nas regiões supraclavicular e cervical de adultos (Virtanen et al., 2009).

Tecido adiposo branco

Os adipócitos brancos são morfologicamente diferentes das outras células, entre outras coisas, devido à presença de uma grande gotícula lipídica (unilocular) rodeada por uma proteína específica, designada por perilipina. A gotícula lipídica pode ocupar até 90% do espaço citoplasmático, estando o núcleo e o restante conteúdo citosólico confinados à periferia da célula (Gesta et al., 2006). Considerado como o maior depósito de energia do organismo, o tecido adiposo e os adipócitos brancos que o constituem assumem um papel indispensável no metabolismo, captando os ácidos gordos livres (FFAs, do inglês, *free fatty acids*) e convertendo-os em triacilgliceróis para

armazenamento a longo prazo e posterior libertação novamente na forma de FFAs para a corrente sanguínea em períodos de necessidade energética (Cook & Cowan, 2008). Adicionalmente, também tem sido reconhecido o seu papel direto e indireto na regulação da resposta à insulina (Ibrahim, 2010), por exemplo por intermédio da secreção de adipocinas que influenciam a sensibilidade da insulina no fígado e no músculo esquelético (Frohnert et al., 2011).

O tecido adiposo comporta-se muito mais como um órgão do que como um tecido isolado, em virtude da grande variedade de células que nele se encontram e da contribuição que exercem para que as suas funções sejam realizadas de modo eficiente. De facto, para além dos adipócitos, o tecido adiposo branco é ainda composto por um conjunto heterogéneo de células, nomeadamente de células vasculares estromais, endoteliais e imunes rodeadas pela matriz extracelular que produzem e secretam citocinas que atuam a nível local (autócrino ou parácrino) e/ou sistémico (Boscaro et al., 2012; O'Rourke et al., 2011). Destas citocinas, as mais estudadas são as que estão envolvidas no: i) metabolismo da glucose, adiponectina e a resistina; ii) metabolismo lipídico, proteína de transferência do colesterol esterificado (CETP, do inglês, *cholesteryl ester transfer protein*); iii) inflamação, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês, *tumor necrosis factor alfa*) e a interleucina 6 (IL-6, do inglês, *interleukin 6*); iv) coagulação sanguínea, inibidor do ativador do plasminogénio (PAI-1, do inglês, *plasminogen activator inhibitor-1*); v) pressão sanguínea, angiotensinogénio e a angiotensina II; vi) comportamento alimentar, leptina. Em conjunto, todas afetam o metabolismo e a função de muitos outros tecidos como por exemplo o tecido muscular esquelético, hepático, cerebral e sistema vascular (Hajer et al., 2008b).

O tecido adiposo é diretamente controlado pelo sistema nervoso autónomo através de seus componentes, simpático e parassimpático. A inervação simpática relaciona-se, principalmente, com as ações catabólicas, tais como a lipólise mediada pelos recetores β -adrenérgicos e dependente da atividade da enzima lipase hormona-sensitiva (HSL, do inglês, *hormone-sensitive lipase*) (Penicaud et al., 2000). Por outro lado, o sistema nervoso

parassimpático está envolvido na execução de efeitos anabólicos sobre os depósitos adiposos, como a captação de glicose e de FFAs estimulada pela insulina (Kreier et al., 2002).

Dependendo da distribuição anatômica, o tecido adiposo branco pode ser classificado como subcutâneo ou visceral. O tecido adiposo subcutâneo inclui a gordura localizada sob a pele, sendo as regiões mais referidas na literatura, a glúteo-femoral, inguinal, anterior e posterior da parede abdominal, enquanto que o VAT se refere à gordura localizada em torno dos órgãos e inclui os depósitos omental, mesentérico, peri-renal, retroperitoneal e epididimal/gonadal (Cook & Cowan, 2008; Prieto-Hontoria et al., 2011).

2.1.2. Tecido adiposo subcutâneo vs. tecido adiposo visceral

Alguns estudos demonstram diferenças significativas nas propriedades metabólicas de acordo com a localização do tecido adiposo – subcutânea ou visceral, reforçando o conceito de heterogeneidade no tecido adiposo. De facto, a expressão de genes envolvidos na homeostasia da glucose, ação da insulina ou no metabolismo lipídico no VAT é diferente relativamente ao subcutâneo (Perusse et al., 2001). Estudos *in vitro* demonstraram que os adipócitos da região visceral são mais sensíveis ao estímulo lipolítico e mais resistentes à supressão da lipólise pela insulina do que os adipócitos da região glúteo-femoral (Calle et al., 1999; Hajer et al., 2008b). Também têm sido descritas alterações na secreção de algumas proteínas, nomeadamente a maior produção de angiotensina, a proteína de ligação de ácidos gordos 4 (FABP4, do inglês, *fatty acid binding protein 4*), a resistina, adiponectina, IL-6 e o TNF- α na região visceral relativamente à subcutânea (Gabriely & Barzilai, 2003; Hofmann et al., 1994), enquanto que a leptina é produzida maioritariamente pelos depósitos subcutâneos (Gaddipati et al., 2010; Shibasaki et al., 2002).

Esta heterogeneidade nos dois subtipos de tecido tem sido explicada pela diferença na densidade dos recetores de algumas hormonas esteróides. Por exemplo, a densidade do recetor de glucocorticoides parece ser mais elevada na região visceral que noutras regiões de tecido adiposo (Bjorntorp, 1990;

Perusse et al., 2001). Neste sentido, o VAT descrito como sendo hormonalmente mais ativo do que o subcutâneo, tem merecido atenção acrescida devido ao papel que parece desempenhar associado a um conjunto de complicações metabólicas e cardiovasculares (Hajer et al., 2008b).

Num estudo coorte, observaram uma correlação positiva entre as medidas da massa gorda e o volume da célula adipócita no VAT, fortemente associadas a complicações metabólicas associadas à obesidade (Spalding et al., 2008). Devido à sua localização anatômica, o VAT drena os seus metabolitos, como os FFAs e as adipocinas na circulação portal onde podem atuar preferencialmente sobre o fígado, afetando assim o metabolismo (Bjorntorp, 1990; Maury & Brichard, 2010). Como consequência, a liberação de FFAs pode induzir resistência à insulina no tecido hepático e fornecer substratos para a síntese de lipoproteínas e armazenamento de lípidos neutros nos hepatócitos (Maury & Brichard, 2010).

2.2. Obesidade

A obesidade pode ser considerada, de uma forma geral, como o resultado de um balanço energético positivo em condições de excesso de energia, caracterizadas por uma abundância de alimentos ricos em calorias e baixa atividade física (Balistreri et al., 2010). A obesidade rapidamente atingiu proporções epidêmicas e tornou-se num dos maiores problemas de saúde pública da atualidade (WHO, 2013). A evidência crescente sobre a obesidade e patologias associadas tem levado ao entendimento do papel do VAT como um dos principais intervenientes no controlo dos processos (pato)fisiológicos.

2.2.1. Alterações dinâmicas da composição do tecido adiposo visceral

Um desequilíbrio crônico de calorias consumidas *versus* despendidas causa um aumento de energia acumulada nos adipócitos sob a forma de gordura (Chang et al., 2012). Desta forma, a expansão da massa gorda manifesta-se, essencialmente, por um aumento dos lípidos intracelulares com um consequente aumento quer do tamanho do adipócito (hipertrofia) quer do aumento do número de adipócitos (hiperplasia) (Tchoukalova et al., 2010). A hipertrofia dos adipócitos é evidente em pacientes com excesso de peso e foi durante muito tempo considerada o principal precursor do aumento da massa adipócita nos adultos. Contudo, a hiperplasia adipócita (ou adipogénese) também é atualmente reconhecida como um fator determinante do aumento da massa adipócita associada à obesidade (Balistreri et al., 2010).

Os fatores que regulam a hipertrofia e a hiperplasia dos adipócitos na obesidade ainda não estão completamente esclarecidos, no entanto as concentrações de insulina e glucocorticoides circulantes têm sido descritas como importantes estimuladores da diferenciação pré-adipócita. Adicionalmente, estudos *in vitro* sugerem que fatores secretados localmente por adipócitos hipertróficos, como o TNF- α e fator de crescimento tipo insulínico (IGF-1, do inglês, *insulin-like growth factor-1*), estimulam a hiperplasia. Outros fatores de transcrição parecem também influenciar a diferenciação dos pré-adipócitos, sendo o recetor ativado pelo proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ , do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) um dos mais importantes e que pode levar à redistribuição ou diminuição do tamanho do adipócito (Hajer et al., 2008b). Um VAT com adipócitos hipertrofiados e hiperplásicos exhibe uma baixa densidade de recetores da insulina e elevados recetores β -3 adrenérgicos, o que facilita a diapedese de monócitos do estroma do tecido adiposo, iniciando o ciclo pró-inflamatório entre os adipócitos e os monócitos (Fernandez-Sanchez et al., 2011). Em conjunto, as alterações associadas com a hipertrofia do adipócito parecem ser os primeiros passos para a disfunção celular do adipócito. De notar que tem sido sugerido que a

hiperplasia adipócita pode ocorrer mais tarde do que a hipertrofia e estar associada a um aumento da severidade e menor reversibilidade nas consequências metabólicas deletérias (de Ferranti & Mozaffarian, 2008).

Numa situação de obesidade, o VAT torna-se inflamado, um estado definido pelo *cross-talk* entre os adipócitos e os macrófagos (Wozniak et al., 2009), com alterações no equilíbrio imunológico para a produção de moléculas pró-inflamatórias (Suganami T, 2005). Esta alteração no perfil de citocinas cria um ambiente propício no tecido para a forte modificação na *pool* dos macrófagos, alterando a predominância de macrófagos do tipo M2 ativados para macrófagos do tipo M1 ativados (Gordon & Taylor, 2005). Adicionalmente, a *pool* de macrófagos do tipo M1 do VAT aumenta significativamente por causa da diferenciação dos monócitos recrutados num VAT inflamado (Lumeng et al., 2007). Este tipo de macrófagos secretam maioritariamente TNF- α e IL-6, enquanto que os macrófagos do tipo M2 secretam preferencialmente citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10, do inglês, *interleukyn 10*) e desempenham funções na reparação dos tecidos (Gordon & Taylor, 2005). Perante um incremento da infiltração de macrófagos tipo M1, o estado inflamatório exaspera com consequências nefastas para o tecido (Weisberg et al., 2003). De facto, em indivíduos obesos, observaram que os macrófagos do VAT também se agregam em “*crown-like structures*” constituídos por *necrotic-like adipocytes* e fragmentos celulares adipócitos (Zeyda et al., 2007), um evento patológico marcante da obesidade (Cinti, 2005).

Os adipócitos brancos de grandes dimensões secretam mais FFAs saturados que se podem ligar aos recetores do tipo *Toll* 4 (TLR-4, do inglês, *toll-like receptor-4*) levando à ativação da via do fator nuclear kappa B (NF-kB, do inglês, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*), que por consequência leva a um aumento da produção de TNF- α (Suganami T, 2005). Por sua vez, o TNF- α derivado dos macrófagos ativa os adipócitos, aumentando a lipólise e a expressão genética de fatores como a ICAM-1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule-1*), MCP-1 e IL-6 (Ruan et al., 2002; Suganami et al., 2007). Particularmente, a MCP-1 e a ICAM-1 facilitam a migração de monócitos do sangue para o tecido adiposo (diapedese) e a sua

diferenciação em macrófagos (Permana et al., 2006). Este circuito local/parácrino, envolvendo os FFAs derivados dos adipócitos e o TNF- α derivado dos macrófagos, estabelece um ciclo vicioso gradual que presumivelmente leva a um estado pró-inflamatório crônico neste dois tipos de células (Lee et al., 2013). Além disso, outro fenômeno típico associado à obesidade é a hipoxia tecidual induzida pela hipoperfusão, devido à rápida expansão do VAT que parece contribuir para o estado inflamatório, através da libertação de mediadores inflamatórios (Trayhurn, 2013).

Por outro lado, os ácidos gordos não esterificados (NEFA, do inglês, *non-sterified fatty acids*) são libertados para a corrente sanguínea e circulam ligados à albumina. Desta forma, elevadas concentrações de FFAs e triacilgliceróis estão intimamente associadas à acumulação de lípidos em vários tecidos, como o hepático, muscular esquelético e células pancreáticas (Boden, 2006; Schaffer, 2003; Zeyda & Stulnig, 2009). Efetivamente, estudos com animais demonstraram que tecidos não-adipócitos quando expostos ao FFAs ou a uma situação de hipertriglicemia são menos capazes de armazenar lípidos do que os adipócitos, tornando-os mais susceptíveis aos seus efeitos adversos (Oakes et al., 2013). Por exemplo, no músculo esquelético, a acumulação de FFAs reduz os substratos de recetores da insulina favorecendo uma situação de resistência à insulina (Fontana et al., 2007; Schaffer, 2003; Yu et al., 2002).

Estas alterações intracelulares decorrentes de uma hipertrofia/hiperplasia adipócita repercutem-se também a nível sistémico. Níveis plasmáticos de TNF- α e da IL-6 aumentados estão correlacionados, por exemplo, com o aparecimento e desenvolvimento da diabetes *mellitus* tipo 2 (Fontana et al., 2007). O efeito do TNF- α é o resultado da fosforilação da serina do recetor da insulina e da ativação da cinase do terminal amínico da proteína C-Jun (JNK, do inglês, *C-Jun N-terminal kinase*) que leva à fosforilação da serina do recetor da insulina, bem como, à fosforilação em serina do substrato recetor da insulina. Ambas as fosforilações em serina mediadas pelo TNF- α levam ao comprometimento da sinalização do recetor da insulina (de Ferranti & Mozaffarian, 2008; Hotamisligil, 1999; Valerio et al., 2006).

Uma das hormonas secretadas pelo tecido adiposo é a adiponectina, com funções em vários processos metabólicos, incluindo a regulação da glicemia e o catabolismo dos FAs. Em indivíduos obesos, os níveis plasmáticos desta hormona estão inversamente correlacionados com a percentagem de gordura (Alfadda, 2014; Lee JY et al., 2001; Mahadik et al., 2013). A adiponectina parece também desempenhar um papel anti-inflamatório importante ao suprimir a produção de TNF- α e da IL-6, no entanto como o nível de infiltração de macrófagos está aumentado na obesidade, a secreção de TNF- α resulta na supressão dos níveis de adiponectina (Huang et al., 2008).

Outra hormona secretada pelos adipócitos é a leptina, reconhecida principalmente pelas suas funções no controlo da hiperfagia e da massa corporal (Denis et al., 2003; Okamatsu-Ogura et al., 2011). Indivíduos obesos apresentam, no entanto, elevados níveis de leptina, sugerindo que o aumento do apetite e o consumo de nutrientes não são suficientemente regulados provocando resistência à leptina hipotalâmica (Munzberg & Myers, 2005).

2.2.2. Disfunção mitocondrial do tecido adiposo visceral

Biologia mitocondrial

Estudos recentes, em células isoladas, revelaram que as mitocôndrias formam uma extensa rede em contínua comunicação sustentada por eventos de fusão e fissão e que se deslocam ativamente para regiões diferentes da célula, tornando este organelo altamente dinâmico (Liesa et al., 2009; Wallace, 2013). A rede mitocondrial é composta por uma membrana externa e interna que delimitam o espaço intermembranar e uma matriz limitada pela membrana interna (Patti & Corvera, 2010). A membrana interna apresenta invaginações onde se encontram proteínas transmembranares da ETC bem como a ATP sintase (Benard & Rossignol, 2008; Vonck & Schafer, 2009). A matriz mitocondrial possui, entre outros, os componentes do ciclo tricarboxílico e da β -oxidação que providenciam os equivalentes reduzidos NADH (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*) e FADH₂ (do inglês, *flavin adenine*

dinucleotide) para a ETC. A oxidação destas moléculas fornece elétrons aos complexos I e II da ETC, respectivamente, que utilizam essa energia para bombear prótons para o espaço intermembranar. Enquanto os elétrons são transferidos entre os complexos cria-se um gradiente eletroquímico. Este gradiente mitocondrial é essencial à manutenção de inúmeras funções celulares e na presença de adenosina difosfato (ADP, do inglês, *adenosine diphosphate*), leva à síntese de ATP no complexo V (ATP sintase) (Alberts et al., 2002). Embora a mitocôndria seja reconhecida principalmente pelo seu papel na produção da maioria do ATP celular via fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês *oxidative phosphorylation*), desempenha outras funções importantes como a metabolização de metabolitos pelo ciclo tricarboxílico e β -oxidação dos FAs, catabolismo oxidativo dos aminoácidos, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), importantes na sinalização celular, controlo do cálcio citoplasmático, morte celular e a síntese dos grupos ferro-enxofre celulares, co-fatores essenciais para as funções celulares, como tradução de proteínas e reparação do ácido desoxirribonucleico (Patti & Corvera, 2010; Rimessi et al., 2008).

Os adipócitos brancos têm sido descritos como contendo baixo conteúdo mitocondrial relativamente a outras células como os adipócitos castanhos ou as células musculares esqueléticas. Contudo, durante a diferenciação dos pré-adipócitos brancos, a densidade e a remodelação mitocondrial aumentam significativamente (Kim et al., 2004; Luo et al., 2008), sugerindo que as funções mitocondriais são cruciais para suportar os múltiplos papéis biológicos dos adipócitos brancos. Curiosamente, um estudo realizado em 14 tecidos diferentes demonstrou que as mitocôndrias dos adipócitos brancos contêm um repertório mais diversificado de proteínas relativamente a mitocôndrias do tecido cardíaco, muscular esquelético ou cerebral (Pagliarini et al., 2008). Desta forma, a mitocôndria do adipócito branco parece estar “equipada” para um amplo conjunto de funções comparativamente a mitocôndrias de outros tecidos que têm de sustentar processos que requerem energia de forma rápida (Patti & Corvera, 2010). A rede mitocondrial é também marcadamente afetada pelo processo de diferenciação adipócita (adipogénese). De facto, a iniciação

sincronizada da adipogénese e da biogénese mitocondrial indica que a mitocôndria desempenha um papel pertinente na diferenciação e maturação dos adipócitos brancos. De facto, a biogénese mitocondrial encontrada na adipogénese em linhas celulares 3T3-L1 é acompanhada por uma remodelação mitocondrial, ou seja, alterações no conteúdo mitocondrial, como a piruvato carboxilase e aconitase, enzimas envolvidas no metabolismo dos FAs, como acil Coenzima A sintase e isoformas de acil Coenzima A desidrogenase (Wilson-Fritch et al., 2003). Adicionalmente, o aumento do consumo de oxigénio basal nos adipócitos comparativamente aos pré-adipócitos parece sugerir um aumento da biogénese mitocondrial durante o processo adipogénico (Zhang et al., 2013). Entender o papel da rede mitocondrial na diferenciação dos adipócitos brancos tem sido alvo de grande interesse uma vez que este processo afeta o destino dos adipócitos brancos e tem uma enorme implicação no tratamento da obesidade (Bournat & Brown, 2010).

Durante o desenvolvimento da obesidade, os pré-adipócitos iniciam respostas adaptativas aos desafios metabólicos, ajustando a abundância e/ou a morfologia das mitocôndrias e o conteúdo de mtDNA. De facto, o conteúdo mitocondrial de adipócitos brancos da região visceral está reduzido em animais e humanos obesos (Choo et al., 2006; Wilson-Fritch et al., 2004) e correlaciona-se com a resistência à insulina. Em ratinhos *ob/ob*, os adipócitos da região visceral apresentam menos 50% de conteúdo mitocondrial relativamente aos ratinhos magros (Wilson-Fritch et al., 2004). Em humanos, o número de cópias do mtDNA é inversamente correlacionado com a idade e com o índice de massa corporal e diretamente correlacionado com a lipogénese basal e induzida pela insulina (Kaaman et al., 2007). Portanto, um baixo conteúdo de mtDNA nos adipócitos pode reduzir significativamente a capacidade do adipócito em armazenar lípidos promovendo a acumulação ectópica de lípidos noutros tecidos incluindo o muscular e o hepático. Paralelamente, a expressão de genes nucleares que codificam para subunidades da OXPHOS está desregulada no VAT de humanos com diabetes

mellitus tipo 2 (Dahlman et al., 2006). Os mecanismos que se associam à redução da densidade mitocondrial na obesidade não são totalmente conhecidos mas parecem ser mediados pela diminuição da expressão de co-ativador 1-alfa do recetor ativado pelo proliferador de peroxissoma gama (PGC-1 α , do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) como foi observado em humanos obesos (Semple et al., 2004). Por outro lado, Toh et al. (2009) e Nishino et al. (2008) referem que murganhos sem uma proteína específica da gotícula lipídica -a Fsp27- aumentaram o dispêndio energético, a resistência à obesidade induzida por uma HFD e melhoraram a sensibilidade à insulina. Este resultado parece ser devido ao aumento da densidade mitocondrial e atividade dos adipócitos brancos e ao aumento da sua capacidade em oxidar grandes quantidades de FAs (Patti & Corvera, 2010).

Alguns estudos realizados com *microarray* revelaram que a expressão de PPAR α , recetor do estrogénio alfa (ERR α , do inglês, *estrogen-related receptor alfa*) e PGC-1 α estão reduzidos em situações de obesidade (Devarakonda et al., 2011; Keller & Attie, 2010; Krishnan et al., 2012), assim como, se verifica uma diminuição da atividade enzimática dos complexos da ETC, além duma alteração da rede mitocondrial. Tudo isto parece contribuir para um declínio funcional da β -oxidação e da OXPHOS no VAT (Choo et al., 2006) em concordância com uma diminuição no consumo de oxigénio (Bogacka et al., 2005).

As ROS são geradas continuamente durante o metabolismo aeróbio. Estas moléculas são produzidas em diferentes locais e por diferentes mecanismos, nomeadamente no decorrer dos processos de transferência de eletrões na ETC e podem causar danos celulares (Ascensao et al., 2011; Ascensao et al., 2003; Brand, 2010; Fisher-Wellman & Neuffer, 2012). Por outro lado, a manutenção dos níveis fisiológicos de ROS é importante para a sinalização celular (Carriere et al., 2004). Um consumo excessivo de calorias tem sido relacionado com um aumento na produção de ROS (De Pauw et al., 2009; Houstis et al., 2006; Villarroya et al., 2009) e parece resultar numa diminuição do consumo de oxigénio nos adipócitos e num bloqueio na oxidação

dos FAs, e consequente acumulação lipídica (Wang et al., 2010). Um aumento de ROS no VAT pode também levar à inibição da proliferação e a diferenciação dos pré-adipócitos em linhas celulares 3T3-L1 (Carriere et al., 2004; Carriere et al., 2003). Nestas condições, observaram uma diminuição das expressões do PPAR γ e de adiponectina e um aumento de adipocinas pró-inflamatórias. Num estudo com animais obesos, verificaram um aumento na produção de ROS, através do aumento da expressão de NADPH oxidase e uma diminuição da expressão de enzimas antioxidantes como, a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e a catalase (Furukawa et al., 2004). Assim, a par de outros mecanismos, uma quantidade excessiva de ROS mitocondrial associada a um aumento de apoptose dependente da mitocôndria são o ponto comum de disfunção celular em condições de lipotoxicidade (Graier et al., 2009).

2.3. O exercício físico como estratégia preventiva e terapêutica contra as alterações no tecido adiposo visceral induzidas pela obesidade

O crescente conhecimento da relação entre a massa gorda e os diferentes processos fisiológicos e (pato)fisiológicos torna o tecido adiposo, em particular a rede mitocondrial, num potencial alvo para o tratamento da obesidade e doenças associadas. Desta forma, as potenciais estratégias modeladoras do VAT devem alvejar alguns destes processos, como a proliferação e/ou diferenciação dos pré-adipócitos, indução da desdiferenciação e apoptose seletiva dos adipócitos maduros, vascularização do tecido adiposo, regulação do metabolismo lipídico, controlo da libertação de adipocinas, dissipação de energia mitocondrial e a produção de ROS pelos adipócitos (Balistreri et al., 2010; Langin, 2010; Nishimura et al., 2007; Suwa et al., 2011). De um vasto conjunto de estratégias propostas na literatura, focaremos a nossa atenção no papel do exercício físico enquanto estratégia não farmacológica com potencial para contrariar os efeitos deletérios associados ao desenvolvimento de alterações na funcionalidade do VAT.

2.3.1. Exercício físico

O exercício e a atividade física são comumente associados aos seus efeitos positivos em diferentes tecidos, particularmente contracteis, no âmbito das doenças metabólicas e cardiovasculares, contudo, também têm impacto, no tecido adiposo (Bostrom et al., 2013). De facto, em situações de obesidade, o treino e a atividade física têm sido utilizados como estratégias numa perspetiva preventiva e terapêutica, com eficácia na diminuição do peso corporal (Hashimoto et al., 2013; Yan et al., 2012), índice de adiposidade visceral (Gollisch et al., 2009), na melhoria do estado metabólico e inflamatório (Baynard et al., 2012; Huang et al., 2012; Kizaki et al., 2011; Ogasawara et al., 2012)

Em animais não obesos, o ET e a VPA crónica diminuem o índice de adiposidade visceral e o tamanho dos adipócitos (Askew & Hecker, 1976; Coutinho et al., 2006; Craig et al., 1981; Hatano et al., 2011; Lira et al., 2012; Miyazaki et al., 2010; Sakurai et al., 2010) de forma controlada, o que se repercute numa diminuição das concentrações séricas de leptina (Benatti et al., 2008; Kimura et al., 2006; Miyazaki et al., 2010). Por outro lado, um programa de nove semanas de ET aumentou a expressão genética do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*) relativamente aos controlos-sedentários, contribuindo para um aumento do número de células endoteliais no VAT (Hatano et al., 2011). Sakurai et al. (2010) reportaram que o treino teve impacto na diferenciação do VAT, por ter diminuído a capacidade das células da fração vascular estromal se diferenciarem em adipócitos, resultante da diminuição da expressão genética de PPAR γ (Sakurai et al., 2010), o que parece ser um indicador de diminuição da acumulação lipídica. Vários estudos demonstraram também que programas de ET e de VPA contribuíram para a melhoria do estado inflamatório e infiltração dos monócitos, através da diminuição da expressão do TNF- α , da IL-6 e do MCP-1 (Lira et al., 2012) e, concomitantemente, com um aumento da IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Donatto et al., 2013). Adicionalmente,

observou-se em animais sujeitos a 4 semanas de ET um aumento no conteúdo das subunidades da OXPHOS, CORE1 (Sutherland et al., 2009) e citocromo C oxidase (Hashimoto et al., 2013; Sutherland et al., 2009), da atividade da citrato sintase, da expressão dos genes que codificam a PGC-1 α e o factor de transcrição mitocondrial A (TFAM, do inglês, *mitochondrial transcription factor A*) nos depósitos epididimal e retroperitoneal. Em conjunto, o exercício aeróbio parece exercer funções importantes na biogénese mitocondrial do VAT, embora sejam necessários mais estudos para verificar se o aumento da expressão de PGC-1 α ocorre de forma coordenada com o aumento da biogénese mitocondrial (Sutherland et al., 2009).

Atividade física voluntária

Vários estudos reportam que a VPA diminuiu os níveis de leptina no plasma (Yan et al., 2012) e no VAT (Baba et al., 2000). Contudo, os estudos são contraditórios relativamente aos níveis de adiponectina no plasma. Fukao et al. (2010) demonstrou que 10 semanas de VPA (acesso livre à roda) aumentaram os níveis plasmáticos de adiponectina em ratos enquanto outros estudos relatam uma diminuição (Kimura et al., 2006). Vários estudos demonstraram, ainda, que a VPA crónica diminuiu os níveis plasmáticos de IL-6 (Fukao et al., 2010) e MCP-1 (Fukao et al., 2010; Yan et al., 2012), a expressão genética de TNF α , (Bradley et al., 2008), F4/80 (Kizaki et al., 2011), PAI-1 e de IKK β (Bradley et al., 2008) no VAT. Contudo, existem estudos que reportaram um aumento da TNF α no depósito mesentérico após 4 semanas de VPA (Baba et al., 2000; Nara et al., 1999). A VPA crónica parece também desempenhar um papel modelador na função mitocondrial no VAT em animais obesos. Laye et al. (2009) encontrou aumentos no conteúdo proteico de citocromo C e de COXIV- subunidade I, no depósito omental em modelo de obesidade OLETF (do inglês, *Otsuka long-evans tokushima fatty*).

Sessão aguda de exercício aeróbio

A compreensão das respostas fisiológicas agudas ao exercício permitem entender os fenómenos adaptativos que ocorrem no tecido adiposo a longo

prazo. Alguns estudos demonstraram que uma única sessão de treino aumenta a expressão genética de PGC-1 α (Sakurai et al., 2005; Sutherland et al., 2009), a atividade e o conteúdo proteico de enzimas reguladoras da homeostasia energética celular, como a malonil CoA descarboxilase (MCD, do inglês, *malonyl-CoA decarboxylase*) e a proteína cinase ativada pelo AMP (AMPk, do inglês, *AMP-activated protein kinase*) (Park et al., 2002; Wan et al., 2013) em modelos de animais hiperfágicos. Adicionalmente, parece haver uma resposta inflamatória e antioxidante, observadas pelo aumento da expressão genética da IkappaB kinase β e do conteúdo proteico da superóxido dismutase manganês (Sakurai et al., 2005).

Treino de endurance

Diversos protocolos experimentais têm apresentado resultados consistentes no que respeita à utilização do ET como estratégia para a atenuar o peso corporal (da Luz et al., 2011; Hashimoto et al., 2013), ganho de peso (Jeong & Yoon, 2012; Speretta et al., 2012), índice de adiposidade visceral (da Luz et al., 2011; Hashimoto et al., 2013) e o tamanho dos adipócitos (Jeong & Yoon, 2012; Speretta et al., 2012) em animais obesos. Estas alterações positivas estão associadas à melhoria da sensibilidade à insulina com um aumento da expressão da GLUT4 (Caponi et al., 2013) e consequente diminuição dos níveis de insulina plasmáticos (Ogasawara et al., 2012). Num estudo em ratos fêmea ooforectomizadas, intervenção descrita como indutora de obesidade a longo prazo, observaram que um programa de natação durante 6 semanas promoveu uma melhoria do perfil lipídico através da diminuição dos níveis de triacilgliceróis e de colesterol no plasma, bem como uma diminuição da acumulação lipídica no músculo esquelético. Adicionalmente, verificaram um aumento na expressão genética de PPAR α no músculo esquelético e as suas enzimas alvo, como a UCP3, responsável pelo aumento da oxidação dos FAs (Jeong & Yoon, 2012). Ogasawara et al. (2012) demonstraram que 9 semanas de ET (passadeira rolante) aumentou a expressão genética e o conteúdo proteico da ATGL e do PPAR γ -2 nos adipócitos da região visceral, sugerindo que o exercício desempenha um papel importante na lipólise.

O efeito do ET na melhoria do estado inflamatório associado à obesidade no VAT parece também ser evidente. De facto, marcadores como F4/80 (Vieira et al., 2009), TNF- α (Speretta et al., 2012), MCP-1 (Baynard et al., 2012; Vieira et al., 2009), JNK, IkappaB, NF-kB (da Luz et al., 2011), TLR4 (Oliveira et al., 2011), macrófagos do tipo M1 (Baynard et al., 2012) diminuíram significativamente. Por outro lado, o exercício também aumenta as citocinas anti-inflamatórias, por exemplo a IL-10 (Speretta et al., 2012). O ET também pode ser uma importante estratégia na diminuição do dano oxidativo. Nove semanas de ET aumentou a capacidade antioxidante, incluindo a atividade e expressão proteica da SOD e CAT (de Farias et al., 2013) .

Treino de força

Do nosso conhecimento, existe apenas um trabalho que analisou o efeito do treino de força no VAT numa situação de obesidade. Speretta *et al.* (2012) comparou 8 semanas de treino de força (subida de degraus) com 8 semanas de exercício aeróbio (natação) e verificou que o treino de força foi eficaz na diminuição do tamanho dos adipócitos e da expressão de TNF- α no VAT de animais submetidos a uma HFD. Estes dados sugerem que o exercício de resistência muscular pode ser alternativa ao exercício aeróbio, contudo serão necessários mais estudos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo do nosso estudo foi analisar o efeito da atividade física voluntária e do treino de endurance realizado em tapete rolante em biomarcadores de função e biogénese mitocondriais do tecido adiposo visceral em ratos submetidos a uma dieta rica em gordura.

Especificamente, foram determinadas alterações:

- i. Em subunidades dos complexos proteicos da cadeia transportadora de eletrões mitocondrial
- ii. Em marcadores de sinalização de biogénese mitocondrial
- iii. Em marcadores do metabolismo energético

4. Metodologia

4.1. Caracterização da amostra

A amostra foi constituída por 36 ratos Sprague-Dawley macho com 6 semanas (125-150g) de idade. No decorrer do protocolo, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, contendo 2 animais por gaiola, em biotério e numa atmosfera normal (21-22°C; 50-60% humidade), com comida e água *ad libitum*, e num ciclo de 12 horas dia/noite.

Durante as dezassete semanas do protocolo experimental, os animais foram submetidos a dietas isocalóricas com diferentes quantidades de lípidos: *standard* (35% das Kcal derivadas dos lípidos) ou HFD (71% das Kcal derivadas dos lípidos) adquiridas à empresa Dyets Inc. (Bethlehem, EUA). Esta dieta tem sido utilizada como um modelo para induzir esteatose hepática não alcoólica, descrita por Lieber-De Carli et al (2004). Após 3 semanas do consumo da dieta, Lieber et al. (2004) observaram uma expansão massiva do VAT, aumento da concentração total de lípidos no tecido hepático e de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo TNF- α , bem como alterações degenerativas mitocondriais, incluindo diminuição da matriz e perda de cristas em mitocôndrias de fígado (Lieber et al., 2004).

Para se adaptarem à consistência líquida da dieta, os animais foram alimentados com a dieta *standard* durante a primeira semana. Posteriormente, os animais foram distribuídos aleatoriamente por seis grupos:

- 1) Dieta *standard* sedentário (SS, n=6),
- 2) Dieta *standard* e atividade física voluntária (SVPA, n=5),
- 3) Dieta *standard* e treino aeróbio (ST, n=6),
- 4) HFD sedentário (HS, n=6),
- 5) HFD e atividade física voluntária (HVPA, n=6)
- 6) HFD e treino aeróbio (HT, n=7)

Os animais dos grupos SVPA e HVPA tiveram acesso à roda livre durante as 17 semanas do protocolo e os grupos ST e HT iniciaram o programa de exercício após 9 semanas, enquanto mantiveram o protocolo das dietas.

Semanalmente procedeu-se à quantificação do volume de dieta ingerida pelos animais. E o consumo energético por semana foi calculado da seguinte forma: 1 mL =1 Kcal, para ambas as dietas.

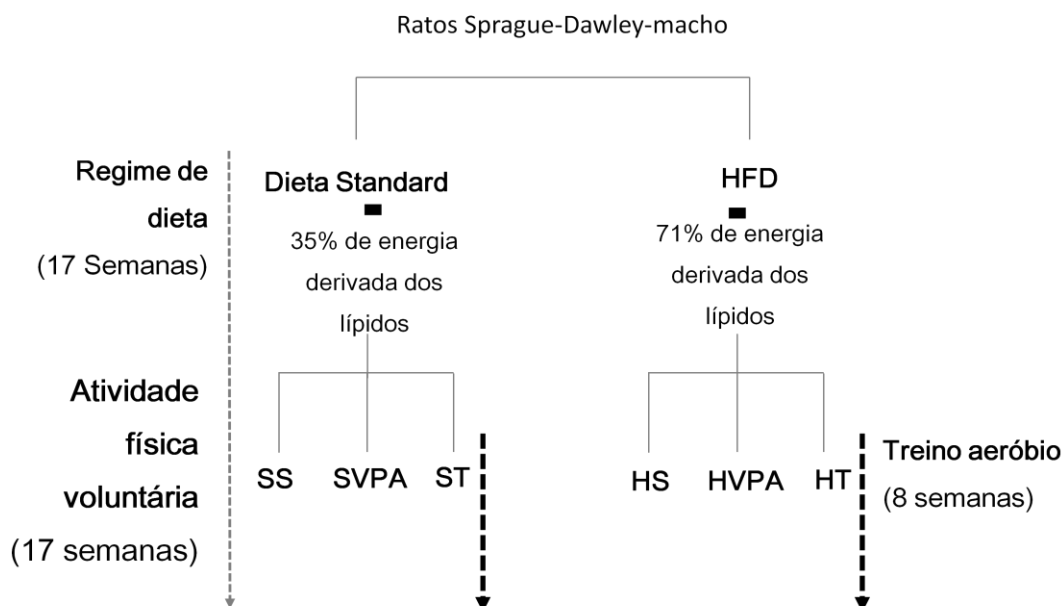


Figura 1: Desenho experimental

O presente estudo foi aprovado pelo comité de ética institucional, que segue as *Guidelines* para o tratamento e uso de animais de laboratório em investigação, aconselhados pela *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)*.

4.2. Programas de exercício

Os animais dos grupos da atividade física voluntária (SVPA e HVPA) foram alojados em gaiolas equipadas com rodas livres com medidores digitais de distância. As distâncias percorridas foram medidas entre as 8:00 e as 10:00h. Os animais submetidos ao protocolo de treino de endurance (ST e HT) tiveram a primeira semana de adaptação à passadeira rolante, 30 minutos a uma velocidade de 15 m.min⁻¹ e sem inclinação. Posteriormente, os animais correram 60 minutos a uma velocidade inicial de 15 m.min⁻¹ aumentando

progressivamente até 25 m.min⁻¹, 5 dias por semana, durante 8 semanas. Durante o protocolo de treino, os animais sedentários (SS e HS) foram colocados numa passadeira rolante imóvel de forma a expor os animais às mesmas condições ambientais e de manuseamento (Ascensao et al., 2006; Lumini-Oliveira et al., 2009).

4.3. Medições anatómicas e recolha de tecidos

No decorrer do protocolo todos os animais foram pesados semanalmente. No final do protocolo, avaliamos alguns parâmetros antropométricos: peso corporal, circunferência abdominal (a zona mais larga do abdómen) e o comprimento corporal (do nariz ao ânus), para calcularmos o índice de massa corporal (BMI, do inglês *body mass index*).

Os animais foram anestesiados (cetamina 90mg/Kg e xilazina 10mg/Kg) entre as 9:00h e as 10:00h da manhã para eliminar possíveis efeitos da variação circadiana. De seguida, procedeu-se à abertura da cavidade abdominal e torácica, os órgãos foram perfundidos com NaCl 0.9% e os depósitos de gordura (omental, mesentérico, perirenal, retroperitoneal e epididimal) foram excisados, lavados e cuidadosamente secos e pesados.

O depósito omental foi excisado desde a grande curvatura do estômago até à região mais distal do intestino delgado, o mesentérico em redor do trato gastrointestinal (do esfíncter gastroesofágico ao final do reto), o peri-renal em torno das regiões anterior e lateral dos rins, o retroperitoneal na parte posterior de cada rim ao longo dos músculos lombares e o depósito epididimal nas áreas em torno do epidídimo e dos testículos. No nosso estudo, utilizamos o depósito epididimal como representativo do VAT.

O músculo esquelético solear foi também retirado e armazenado para a determinar a atividade da enzima citrato sintase.

O BMI foi calculado como o rácio entre o comprimento e o peso corporal (BMI= peso corporal (g) / comprimento corporal (cm)²), o índice de adiposidade visceral como o rácio do somatório do peso dos depósitos de VAT sobre o peso corporal a multiplicar por 100 (Novelli et al., 2007; van den Brandt et al., 2002).

4.4. Western blotting

Para extração de proteína, as amostras do depósito epididimal (~0,5g) foram homogeneizadas com Polytron® (PT10-35GT) e colocadas em 0.8 mL de solução RIPA contendo TRIS-HCl (50mM, pH 7.4), EDTA (1mM), SDS (0.2%), DOC (0.2%), Triton X-100 (1%) e cocktail de inibidores de protease (1:100, *Sigma-Aldrich*, #P8340) (Monteiro et al., 2008). Posteriormente, foram sonicadas durante 15 minutos a 4.°C, centrifugadas a 13000xg durante 10 minutos a 4.°C, aproveitando o infranadante. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando o soro de albumina de boi (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) como padrão (Bradford, 1976).

As amostras foram solubilizadas em solução *loading*, contendo *Laemmli* e β -metacarpoetanol, e fervidas a 97.° C durante 5 minutos. As proteínas foram separadas electroforéticamente em gel SDS-poliacrilamida, de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (Millipore, EUA). Após a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau S*, lavadas com água destilada, e posteriormente bloqueadas com 5% de BSA, ou leite magro em pó em TBS-T, durante duas horas à temperatura ambiente em agitação, de forma a reduzir a ligação não específica. As membranas foram lavadas 3 vezes (durante 5 minutos) e incubadas com um anticorpo primário específico para OXPHOS (1:1000, #Ab110413), ANT (1:1000, #SC-9299), TFAM (1:1000, #SC-23588), SIRT3 (1:5000, Cell Signaling #C73E3) e PGC1- α (1:500, #Ab106814) durante a noite, a 4.°C. No dia seguinte, as membranas voltaram a ser lavadas 3 vezes e incubadas em solução anti-mouse (1:10000, #SC-2005) ou anti-rabbit (1:10000, #SC-2004) ou anti-goat (1:10000, #SC-2354) duas horas à temperatura ambiente em agitação. As membranas foram expostas ao substrato enzimático (ECL, GE Health Care) durante 5 minutos e, finalmente reveladas no sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, EUA). As imagens foram gravadas e analisadas utilizando o programa Image Lab versão 3.0 (Bio-Rad, EUA).

4.5. Procedimentos estatísticos

Para a análise dos dados recolhidos recorreu-se ao programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad software, EUA). A média e erro padrão da média foram calculados para todas as variáveis de cada grupo. O significado estatístico foi determinado pelo teste de análise de variância *2-way Anova* e quando encontradas diferenças significativas recorremos ao teste *post hoc* de *Bonferroni*. O nível de significância foi estabelecido em 5 %.

5. Resultados

- Caracterização dos animais

A tabela 1 apresenta os valores médios e o respetivo desvio-padrão do peso corporal, índice de massa corporal, índice de adiposidade visceral, rácio peso baço/peso corporal, rácio peso coração/peso corporal e da atividade da citrato sintase do músculo solear. Pela análise da tabela, observamos que os animais submetidos a uma HFD demonstraram um aumento do índice de massa corporal (HVPA vs. SVPA) e do índice de adiposidade visceral (HS vs. SS; HVPA vs. SVPA; HT vs. ST). A VPA diminuiu o peso corporal nos animais submetidos à dieta standard (SVPA vs. SS;) e o índice de adiposidade visceral nos animais submetidos à HFD (HVPA vs. HS). O ET em tapete rolante foi eficaz na diminuição do peso corporal (ST vs. SS; HT vs. HS), do índice de massa corporal (ST vs. SS; HT vs. HS) e do índice de adiposidade visceral (ST vs. SS; HT vs. HS) dos animais de ambos os grupos.

Os baços foram pesados para avaliarmos a esplenomegalia, um indicador de geral de disfunção imune e infeção, não tendo sido observadas alterações significativas no rácio baço/peso corporal entre os grupos.

O rácio coração/peso corporal aumentou nos animais treinados, concomitante com um aumento da atividade da enzima citrato sintase no músculo solear (ST vs. SS; HT vs. HS), indicador de capacidade oxidativa e de efetividade do treino no desenvolvimento de adaptações aeróbias a nível muscular.

Tabela 1: Efeito da dieta, atividade física voluntária e treino de endurance nos indicadores anatômicos: peso corporal; índice de adiposidade visceral; índice de massa corporal; rácio baço/peso corporal; rácio coração/ peso corporal; atividade citrato sintase no músculo solear

	SS	SVPA	ST	HS	HVPA	HT	Valor de p ^a
Peso corporal (g)	676.8±11.5	612.7±15.3 ^b	559.3±10.0 ^b	684.3±14.2	710.0±10.8 ^c	592.8±7.3 ^{e,f}	DxE
Índice de massa corporal	0,8±0,002	0,7±0,02	0,7±0,01 ^{b,c}	0,8±0,02	0,8±0,01 ^c	0,7±0,01 ^{e,f}	D; E
Índice de adiposidade visceral (%)	9.0±0.2	7.5±0.5 ^b	4.8±0.5 ^{b,c}	10.8±0.4 ^b	8.9±0.4 ^{c,e}	6.8±0.1 ^{d,e,f}	D; E
Rácio baço/peso corporal	1.04±0.05	1.05±0.03	1.08±0.07	1.08±0.03	1.04±0.04	0.9±0.04	NS
Rácio coração/peso corporal	0.003±0.0001	0.003±0.0002	0.004±0.0001 ^b	0.003±0.0001	0.003±0.0001	0.003±0.0001 ^e	D; E
Atividade citrato sintase do solear (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	0.03±0.004	0.04±0.002	0.05±0.004 ^b	0.04±0.004	0.03±0.001	0.05±0.002 ^{e,f}	E

Os valores são médias ± desvio padrão da média. SS-Dieta *standard* sedentário; SVPA-Dieta *standard* e atividade física voluntária; ST-Dieta *standard* e treino aeróbio; HS-HFD sedentário; HVPA-HFD e atividade física voluntária; HT-HFD e treino aeróbio (P<0,05). ^a Significativo (p<0,05),efeito da dieta (D), do exercício (E), interação entre dieta e exercício (DxE) ou a ausência de diferenças (NS); ^b vs. SS; ^c vs. SVPA; ^d vs. ST; ^e vs. HS; ^f vs. HVPA; ^g vs. HT.

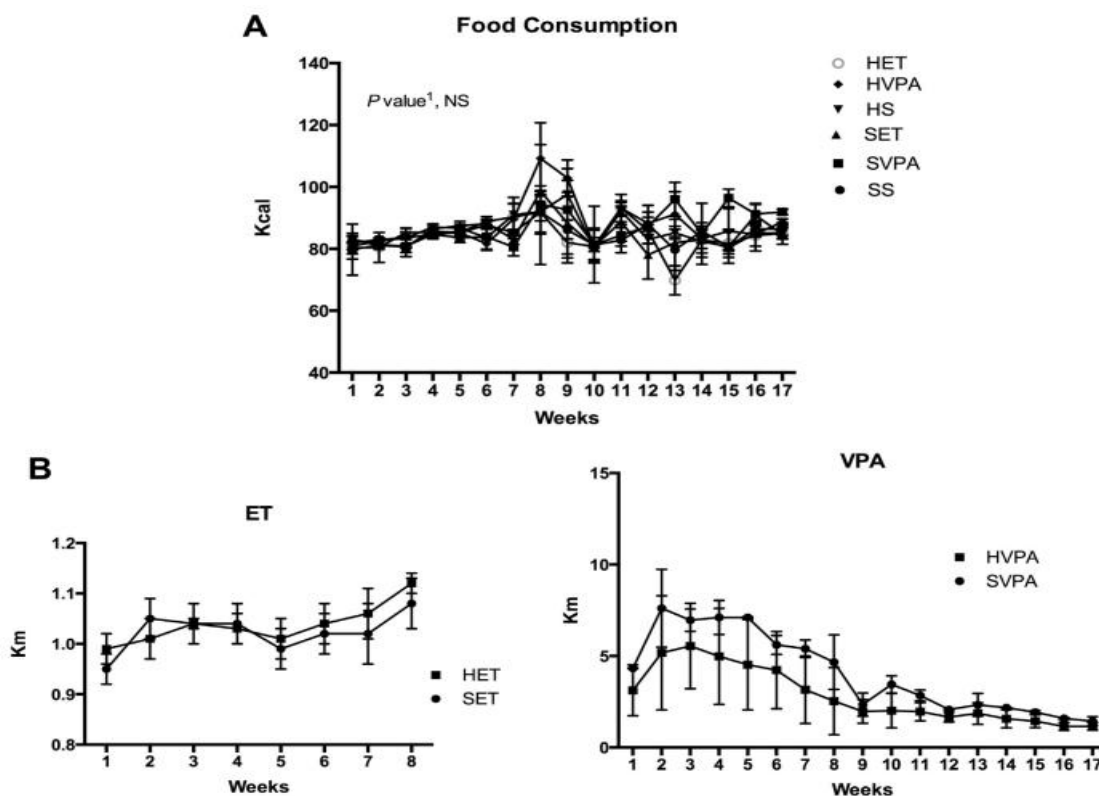


Figura 2: Dieta ingerida (A) e distância percorrida em tapete rolante (ET) e na roda livre (VPA) (B) por semana.

Os valores são médias $\pm$ desvio padrão da média. ¹ Significativo ($p < 0,05$), efeito da dieta (D), do exercício (E), interação entre dieta e exercício (DxE) ou a ausência de diferenças (NS).

Adaptado de: Gonçalves, Passos, Rocha-Rodrigues, Torrella, et al. (2014), p. 3.

Não observamos alterações significativas entre grupos no consumo calórico e nas distâncias percorridas na roda livre e em tapete rolante.

- Função e biogénese mitocondrial

Foram determinados os conteúdos de importantes subunidades proteicas de cada um dos cinco complexos da ETC (Figura 2). Não verificamos o efeito da dieta e do ET nos conteúdos dessas subunidades nos complexos I, II e III da ETC.

Os animais submetidos à HFD exibiram uma diminuição da expressão proteica das subunidades do complexo IV (SVPA vs. HVPA;) e V (SVPA vs. HVPA).

A VPA crónica não induziu alterações significativas nas subunidades da ETC.

O programa de ET aumentou os níveis proteicos da subunidade do complexo IV em ambos os grupos de animais (ST vs. SS; HT vs. HS) e do complexo V, apenas nos animais sujeitos à dieta *standard* (ST vs. SS).

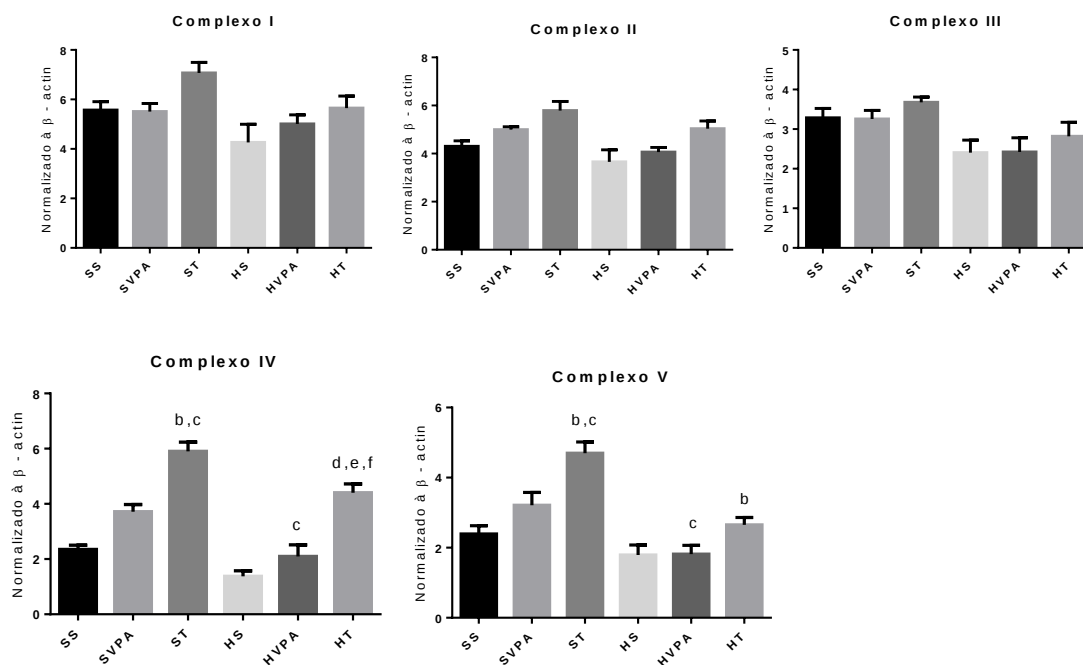


Figura 3: Efeito da dieta, atividade física voluntária e do treino aeróbico no conteúdo proteico das subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons.

Os valores são médias $\pm$ desvio padrão da média. SS-Dieta *standard* sedentário; SVPA-Dieta *standard* e atividade física voluntária; ST-Dieta *standard* e treino aeróbico; HS-HFD sedentário; HVPA-HFD e atividade física voluntária; HT-HFD e treino aeróbico ($P < 0,05$). ^a Significativo ($p < 0,05$), efeito da dieta (D), do exercício (E), interação entre dieta e exercício (DxE) ou a ausência de diferenças (NS); ^b vs. SS; ^c vs. SVPA; ^d vs. ST; ^e vs. HS; ^f vs. HVPA; ^g vs. HT.

A dieta, VPA e o ET não induziram alterações significativas nos níveis proteicos de ANT (Figura 3).

Os animais submetidos à HFD apresentaram uma diminuição na expressão de PGC1- α no grupo HT comparativamente ao ST, e de TFAM em todos os grupos (HS vs. SS; HVPA vs. SVPA; HT vs. ST). Não verificamos alterações significativas no conteúdo proteico de PGC1- α e de TFAM após 17 semanas de VPA.

O ET reverteu a diminuição induzido pela HFD na expressão proteica de PGC-1 α (ST vs. SS; HT vs. HS) e de TFAM (ST vs. SS; HT vs. HS).

A dieta e a VPA não induziram alterações significativas no conteúdo proteico de SIRT3

Após 8 semanas de ET verificamos uma diminuição do conteúdo proteico de SIRT3, nos animais sujeito a uma HFD (HT vs. HVPA).

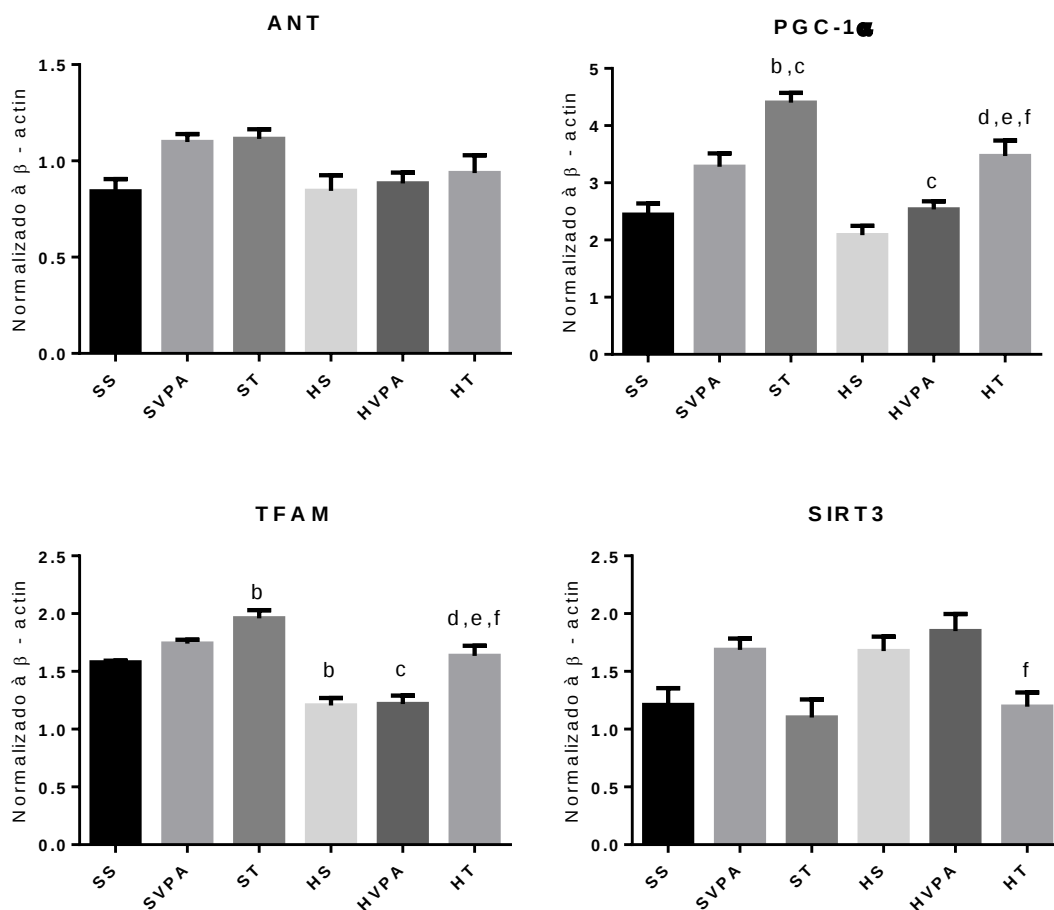


Figura 4: Efeito da dieta e do exercício no conteúdo proteico de ANT, PGC-1 α , TFAM e SIRT3.

Os valores são médias $\pm$ desvio padrão da média. SS-Dieta *standard* sedentário; SVPA-Dieta *standard* e atividade física voluntária; ST-Dieta *standard* e treino aeróbico; HS-HFD sedentário; HVPA-HFD e atividade física voluntária; HT-HFD e treino aeróbico ($P < 0,05$). ^a Significativo ($p < 0,05$), efeito da dieta (D), do exercício (E), interação entre dieta e exercício (DxE) ou a ausência de diferenças (NS); ^b vs. SS; ^c vs. SVPA; ^d vs. ST; ^e vs. HS; ^f vs. HVPA; ^g vs. HT.

6. Discussão dos Resultados

A obesidade atingiu proporções epidémicas e, conjuntamente com as doenças associadas, tornou-se num dos maiores problemas de saúde pública da atualidade (WHO, 2013). O VAT tem sido reconhecido como o principal interveniente no controlo dos processos (pato)fisiológicos associados à obesidade, como a resistência periférica à insulina, dislipidemias e diabetes *mellitus* tipo II (Pedersen & Saltin, 2006). Tal como noutros tecidos, a atividade metabólica mitocondrial, bem como o conjunto de processos fisiológicos nos quais o envolvimento da mitocôndria é elevado, apresentam-se decisivas no controlo das alterações, não só da bioenergética e do metabolismo celulares, mas também nos destinos, dinâmica, plasticidade, renovação e alteração fenotípica do tecido. Assim sendo, o estudo do metabolismo e função mitocondriais no tecido adiposo, quer na obesidade quer decorrente da realização de exercício, tornou-se determinante na compreensão dos mecanismos associados a esta condição patológica e à forma como ela pode ser mitigada pelo exercício físico. No presente estudo, utilizámos as variações de alguns biomarcadores proteicos da função e metabolismo mitocondriais para avaliar o efeito do exercício na resposta do VAT de animais obesos (em consequência da ingestão de uma dieta rica em gordura). Efetivamente, a expansão excessiva do VAT parece estar associada a complicações ao nível mitocondrial, podendo levar à disfunção mitocondrial no próprio tecido.

O desenvolvimento de modelos animais obesos tem sido útil para perceber os mecanismos envolvidos nesta patologia, assim como as potenciais estratégias para prevenir e combater os seus efeitos adversos (Goncalves, Passos, Rocha-Rodrigues, Torrella, et al., 2014). Assim, a nossa amostra foi constituída por ratos *Sprague Dawley* macho, submetidos a dois tipos de dietas isocalóricas *ad libitum*, uma dieta *standard* e uma HFD, sendo que a HFD foi utilizada com o objetivo de induzir esteatose hepática não alcoólica (Lieber et al., 2004). Optamos pela utilização de ratos, devido ao facto, de este animal ser considerado um modelo adequado que mimetiza alterações estruturais e funcionais observadas no humano (Monti et al., 1995). Utilizamos a estirpe

Sprague Dawley, por ser uma estirpe indicada na literatura para a indução da referida condição patológica a nível hepática e obesidade através de dietas (Goncalves, Passos, Rocha-Rodrigues, Torrella, et al., 2014). Escolhemos animais do sexo masculino de forma a evitar eventuais variações hormonais passíveis de influenciar as defesas e a resposta metabólica dos animais, nomeadamente a concentração de estrogénios (Lagranha et al., 2010).

A modificação dos estilos de vida com foco na atividade física tem sido considerada como a primeira linha de tratamento contra a obesidade (Goncalves, Passos, Rocha-Rodrigues, Torrella, et al., 2014). Contudo, o efeito da atividade física em resposta às alterações induzidas por uma HFD na mitocôndria do VAT tem sido pouco estudado. No nosso trabalho, foram utilizados dois modelos de exercício: a VPA e o ET “forçado” realizado em tapete rolante. A VPA foi utilizada como estratégia de prevenção contra os efeitos deletérios associados à obesidade, enquanto que o ET foi utilizado como estratégia terapêutica.

O objetivo do nosso estudo foi analisar o efeito da VPA e do ET realizado em tapete rolante em biomarcadores de função e biogénese mitocondria do VAT em ratos submetidos a uma HFD.

Como referido, a dieta utilizada tem sido descrita como um modelo para induzir esteatose hepática não alcoólica (Lieber et al., 2004). Esta dieta induz igualmente um estado de obesidade nos animais, o que se verificou pelo aumento do índice de massa corporal e do índice de adiposidade visceral, como anteriormente descrito noutros trabalhos (Baynard et al., 2012; da Luz et al., 2011; Farias et al., 2012; Goncalves, Passos, Rocha-Rodrigues, Torrella, et al., 2014; Oliveira et al., 2011).

Em termos gerais, o protocolo de treino foi efetivo na promoção de adaptações a nível do sistema cardiovascular e do metabolismo oxidativo muscular esquelético, uma vez que se verificou um aumento do rácio coração/peso corporal concomitante com o aumento da atividade da enzima citrato sintase no músculo solear dos animais sujeitos ao treino aeróbio, respetivamente (Ascensao et al., 2006).

- Parâmetros anatômicos

A VPA não preveniu o aumento de peso corporal nos animais sujeitos a uma HFD, tal como se verificou noutros estudos (Fukao et al., 2010; Goncalves, Passos, Rocha-Rodrigues, Torrella, et al., 2014), o que parece estar associado com a baixa intensidade a que é realizada, não promovendo assim alterações significativas no peso corporal (Irving et al., 2008). Já no que respeita ao índice de adiposidade visceral, verificou-se uma diminuição do mesmo, em linha com o que se tem verificado noutros estudos (Bradley et al., 2008; Gollisch et al., 2009; Yan et al., 2012), o que sugere que a atividade física voluntária promove uma modelação positiva da adiposidade visceral (Goncalves, Passos, Rocha-Rodrigues, Torrella, et al., 2014).

O ET promoveu uma diminuição do peso corporal, do índice de massa corporal e do índice de adiposidade visceral dos animais submetidos à HFD, em linha com o que se tem verificado noutros trabalhos (da Luz et al., 2011; Speretta et al., 2012), embora existam alguns estudos onde estas alterações não se verificaram (Baynard et al., 2012; Oliveira et al., 2011). A principal explicação para esta diferença de resultados parece ser a intensidade a que os protocolos de treino foram realizados, visto que existem evidências de que só uma intensidade adequada de exercício parece ser capaz de induzir diminuições significativas nestes parâmetros anatômicos (Irving et al., 2008).

-Função e biogénese mitocondrial

Tem sido descrito que o consumo de uma HFD pode levar à disfunção mitocondrial em tecidos como o músculo esquelético (Sadler et al., 2012) e o fígado (Goncalves, Passos, Rocha-Rodrigues, Diogo, et al., 2014). A mitocôndria, tal como noutros tecidos, desempenha um papel importante no VAT, nomeadamente, na diferenciação e maturação dos adipócitos (Wilson-Fritch et al., 2003) no metabolismo energético (Cho et al., 2009; Patti & Corvera, 2010), e na manutenção do estado redox (Carriere et al., 2004). Existem alguns trabalhos que sugerem que a expansão excessiva do VAT, característico de uma situação de obesidade, leva à disfunção mitocondrial no próprio tecido (Choo et al., 2006; Koh et al., 2007; Wilson-Fritch et al., 2004).

Contudo, os mecanismos que levam à disfunção mitocondrial no VAT ainda não estão bem claros. Assim, no nosso trabalho, analisamos o efeito da HFD na expressão proteica de subunidades dos complexos da ETC, ANT, TFAM, e PGC1- α , tentando perceber a resposta do tecido a esta combinação de estímulos (dieta hipercalórica e gorda e exercício físico). Centramos o nosso foco em marcadores associados à performance do sistema fosforilativo (subunidades dos complexos da ETC e ANT), de biogénese mitocondrial (TFAM, e PGC1- α) e da SIRT3, uma desacetilase que tem sido descrita como um importante regulador metabólico (Lombard et al., 2007).

Ao analisarmos a expressão proteica de importantes indicadores de função mitocondrial como subunidades dos complexos da ETC e o ANT não observamos alterações significativas no conteúdo proteico de ANT e dos complexos I a III, mas verificamos que a HFD promoveu uma diminuição da expressão proteica das subunidades dos complexos IV e V. Do nosso conhecimento, não existe nenhum trabalho que tenha analisado a expressão proteica de subunidades dos complexos da ETC no VAT de animais sujeitos a uma HFD. Contudo, Choo et al. (2006) observam uma perda do conteúdo mitocondrial em animais obesos *ob/ob*, o que pode sugerir que a disfunção mitocondrial pode estar associada à disfunção tecidual.

Para tentar perceber o efeito de uma HFD ao nível da biogénese mitocondrial no VAT, analisamos a expressão proteica de PGC-1 α e de TFAM, dois reconhecidos biomarcadores. Atendendo aos nossos resultados, o consumo de uma HFD parece levar ao comprometimento da biogénese mitocondrial, visto que, o conteúdo proteico de PGC-1 α e de TFAM se apresentou diminuído nos animais sedentários submetidos a esta dieta.

A VPA e o ET têm sido apontados como estratégias para mitigar, quer prevenindo quer tratando os efeitos deletérios da obesidade. Contudo, existem poucos trabalhos, que tenham estudado o efeito da VPA e do ET na mitocôndria de VAT. Estudos realizados em animais *wildtype* e OLEFT com acesso à roda livre observaram um aumento do conteúdo proteico de COXIV (Laye et al., 2009; Ringholm et al., 2013) e de citocromo c (Laye et al., 2009) no VAT, o que sugere que a VPA pode contribuir para o aumento do conteúdo

proteico do complexo IV. Contudo, no nosso trabalho não observamos alterações induzidas pela VPA nos biomarcadores de função mitocondrial.

O efeito do ET, na expressão proteica das subunidades do sistema de OXPHOS no VAT tem sido pouco estudado. No nosso trabalho, observamos um aumento do conteúdo proteico das subunidades analisadas nos complexos IV e V nos animais submetidos a uma dieta *standard*, após 8 semanas de ET, em linha com o estudo de Sutherland et al. (2009), os quais observaram um aumento do conteúdo proteico dos complexos III e IV. Estes resultados parecem sugerir que treino induz um incremento do fluxo metabólico do tecido, possivelmente ativando vias de sinalização celular e mitocondriais conducentes ao aumento da performance dos referidos complexos e, consequentemente, da atividade da ETC.

Tal como se verificou nos animais submetidos a uma dieta *standard*, o ET promoveu um aumento do conteúdo proteico do complexo IV, nos animais sujeitos à HFD, o que vai de encontro ao único estudo publicado até ao momento que analisou o efeito do ET na expressão proteica de subunidades dos complexos da ETC no VAT de animais obesos, no qual foi observado um aumento do conteúdo proteico de COXIV (Hashimoto et al., 2013). Estes resultados sugerem que o ET, ao promover um aumento do conteúdo proteico de importantes indicadores de função mitocondrial, pode estar associado a uma melhoria da função mitocondrial no VAT.

Atendendo aos nossos resultados, é possível observar que os dois indicadores de biogénese mitocondrial analisados, PGC-1 α e TFAM, apresentaram um aumento pelo exercício do conteúdo proteico nos animais submetidos à dieta *standard*. Do conhecimento, nenhum estudo até ao momento analisou a expressão proteica de PGC-1 α e TFAM no VAT de animais não obesos. Contudo, um programa de ET aumentou a expressão de genes que codificam a PGC-1 α e o TFAM (Sutherland et al., 2009).

O único estudo, encontrado por nós (Hashimoto et al., 2013), que analisou o efeito do exercício no conteúdo proteico de PGC-1 α , em animais obesos, observou apenas uma tendência para o aumento do conteúdo proteico de PGC-1 α . Porém os resultados do nosso trabalho indicam que o exercício

aumenta o conteúdo proteico de PGC-1 α e de TFAM, o que em conjunto com o aumento do conteúdo proteico das subunidades do complexo IV pode sugerir que o treino aeróbio aumenta a biogénese mitocondrial no VAT de animais obesos submetidos a uma HFD. Parece ser importante referir que as variações observadas resultaram da quantificação dos respetivos marcadores no homogeneizado de VAT, tendo sido relativizados à expressão de β -actina. Contudo, tratando-se de proteínas ou subunidades proteicas mitocondriais e perante a suspeita de incremento de biogénese deste importante organelo, é possível que as variações encontradas se devam ao incremento da rede mitocondrial.

A SIRT3 é uma desacetilase localizada na membrana mitocondrial interna (Shi et al., 2005) que tem sido descrita como um importante regulador metabólico (Lombard et al., 2007). Em animais com obesidade induzida por uma HFD (Jing et al., 2011) observou-se uma diminuição da expressão proteica de SIRT3, no músculo esquelético, o que parece estar relacionado com a disfunção mitocondrial e aumento do stress oxidativo (Jing et al., 2011). Em oposição, numa situação de restrição calórica, verificou-se um aumento da expressão proteica de SIRT3, no tecido adiposo branco (Shi et al., 2005), e no músculo esquelético de animais com acesso à roda livre (Palacios et al., 2009). Do nosso conhecimento, não existem estudos que tenham analisado a expressão proteica de SIRT3 numa situação de excesso de fornecimento de energia, como a submissão a uma HFD, no VAT, assim, propusemo-nos a fazer esta análise mas não encontramos alterações significativas no que diz respeito ao efeito da dieta, bem como da VPA. Contudo, contrariamente ao que esperávamos o ET promoveu uma diminuição da expressão proteica de SIRT3 nos animais sujeitos a uma HFD. Novos estudos deverão ser realizados para melhor compreender a modelação induzida pelo ET na expressão de SIRT3.

7. Conclusões

Em termos gerais, os resultados do presente trabalho sugerem que o ET parece representar um estímulo promotor de alterações na composição corporal e na bioenergética mitocondrial do VAT.

Paralelamente com a diminuição do índice de adiposidade, o ET parece ter promovido incrementos na expressão de subunidades dos complexos proteicos da ETC mitocondrial bem como na expressão de TFAM e PGC-1 α , importantes marcadores de biogénese mitocondrial.

É possível que esta adaptação conducente ao incremento da massa mitocondrial do VAT possa ser considerada um dos mecanismos pelos quais o exercício físico apresenta um carácter modelador do fenótipo do VAT na obesidade, podendo constituir-se como um mecanismo alvo na prevenção e terapêutica da doença.

Dadas as diferentes funções da mitocôndria, não só na bioenergética celular, mas também na diferenciação, plasticidade e destinos teciduais, futuros estudos deverão ser perseguidos no sentido de perceber se o aumento da massa mitocondrial com o exercício se constitui benéfica para a patologia pela possibilidade de aumento do dispêndio energético do tecido ou, por outro lado, pela sua influência no controlo da diferenciação, renovação e mecanismos de morte celular.

8. Referências bibliográficas

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland Science.
- Alfadda, A. A. (2014). Circulating Adipokines in Healthy versus Unhealthy Overweight and Obese Subjects. *Int J Endocrinol*, 2014, 170434.
- Ascensao, A., Lumini-Oliveira, J., Oliveira, P. J., & Magalhaes, J. (2011). Mitochondria as a target for exercise-induced cardioprotection. In *Curr Drug Targets* (Vol. 12, pp. 860-871). Netherlands.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J., Oliveira, J., & Duarte, J. A. (2003). Exercise and cardiac oxidative stress. *Rev Port Cardiol*, 22(5), 651-678.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J. M., Ferreira, R., Neuparth, M. J., Marques, F., Oliveira, P. J., & Duarte, J. A. (2006). Endurance training limits the functional alterations of rat heart mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation. In *Int J Cardiol* (Vol. 109, pp. 169-178). Ireland.
- Askew, E. W., & Hecker, A. L. (1976). Adipose tissue cell size and lipolysis in the rat: response to exercise intensity and food restriction. *J Nutr*, 106(9), 1351-1360.
- Baba, T., Kanda, T., Yoshida, A., Tsukui, S., Nara, M., Inukai, T., Umeda, T., Tamura, J., & Kobayashi, I. (2000). Reciprocal changes in leptin and tumor necrosis factor-alpha with exercise in insulin resistant rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 108(1-2), 133-143.
- Balistreri, C. R., Caruso, C., & Candore, G. (2010). The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*, 2010, 802078.
- Baynard, T., Vieira-Potter, V. J., Valentine, R. J., & Woods, J. A. (2012). Exercise training effects on inflammatory gene expression in white adipose tissue of young mice. *Mediators Inflamm*, 2012, 767953.
- Benard, G., & Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal*, 10(8), 1313-1342.
- Benatti, F. B., Polacow, V. O., Ribeiro, S. M., Gualano, B., Coelho, D. F., Rogeri, P. S., Costa, A. S., & Lancha Junior, A. H. (2008). Swimming training down-regulates plasma leptin levels, but not adipose tissue ob mRNA expression. *Braz J Med Biol Res*, 41(10), 866-871.
- Bjorntorp, P. (1990). How should obesity be defined? *J Intern Med*, 227(3), 147-149.
- Boden, G. (2006). Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep*, 6(3), 177-181.
- Bogacka, I., Ukropcova, B., McNeil, M., Gimble, J. M., & Smith, S. R. (2005). Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. In *J Clin Endocrinol Metab* (Vol. 90, pp. 6650-6656). United States.
- Boscaro, M., Giacchetti, G., & Ronconi, V. (2012). Visceral adipose tissue: emerging role of gluco- and mineralocorticoid hormones in the setting of cardiometabolic alterations. *Ann N Y Acad Sci*, 1264, 87-102.

- Bostrom, P. A., Graham, E. L., Georgiadi, A., & Ma, X. (2013). Impact of exercise on muscle and nonmuscle organs. *IUBMB Life*, 65(10), 845-850.
- Bournat, J. C., & Brown, C. W. (2010). Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 17(5), 446-452.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In *Anal Biochem* (Vol. 72, pp. 248-254). United States.
- Bradley, R. L., Jeon, J. Y., Liu, F. F., & Maratos-Flier, E. (2008). Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. In *Am J Physiol Endocrinol Metab* (Vol. 295, pp. E586-594). United States.
- Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. In *Exp Gerontol* (Vol. 45, pp. 466-472). England: 2010 Elsevier Inc.
- Calle, E. E., Thun, M. J., Petrelli, J. M., Rodriguez, C., & Heath, C. W., Jr. (1999). Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. In *N Engl J Med* (Vol. 341, pp. 1097-1105). United States.
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. In *Physiol Rev* (Vol. 84, pp. 277-359). United States.
- Carriere, A., Carmona, M. C., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Wenger, R. H., Penicaud, L., & Casteilla, L. (2004). Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. In *J Biol Chem* (Vol. 279, pp. 40462-40469). United States.
- Carriere, A., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Penicaud, L., & Casteilla, L. (2003). Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. In *FEBS Lett* (Vol. 550, pp. 163-167). Netherlands.
- Chang, S. H., Beason, T. S., Hunleth, J. M., & Colditz, G. A. (2012). A systematic review of body fat distribution and mortality in older people. In *Maturitas* (Vol. 72, pp. 175-191). Ireland.
- Cho, S. Y., Park, P. J., Shin, E. S., Lee, J. H., Chang, H. K., & Lee, T. R. (2009). Proteomic analysis of mitochondrial proteins of basal and lipolytically (isoproterenol and TNF-alpha)-stimulated adipocytes. *J Cell Biochem*, 106(2), 257-266.
- Choo, H. J., Kim, J. H., Kwon, O. B., Lee, C. S., Mun, J. Y., Han, S. S., Yoon, Y. S., Yoon, G., Choi, K. M., & Ko, Y. G. (2006). Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia*, 49(4), 784-791.
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. In *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* (Vol. 73, pp. 9-15). Scotland.
- Cinti, S. (2006). The role of brown adipose tissue in human obesity. In *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (Vol. 16, pp. 569-574). Germany.
- Cook, A., & Cowan, C. (2008). Adipose. In *StemBook*. Cambridge (MA).
- Coutinho, A. E., Fediuc, S., Campbell, J. E., & Riddell, M. C. (2006). Metabolic effects of voluntary wheel running in young and old Syrian golden hamsters. In *Physiol Behav* (Vol. 87, pp. 360-367). United States.

- Craig, B. W., Hammons, G. T., Garthwaite, S. M., Jarett, L., & Holloszy, J. O. (1981). Adaptation of fat cells to exercise: response of glucose uptake and oxidation to insulin. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 51(6), 1500-1506.
- da Luz, G., Frederico, M. J., da Silva, S., Vitto, M. F., Cesconetto, P. A., de Pinho, R. A., Pauli, J. R., Silva, A. S., Cintra, D. E., Ropelle, E. R., & De Souza, C. T. (2011). Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. *Eur J Appl Physiol*, 111(9), 2015-2023.
- Dahlman, I., Forsgren, M., Sjogren, A., Nordstrom, E. A., Kaaman, M., Naslund, E., Attersand, A., & Arner, P. (2006). Downregulation of electron transport chain genes in visceral adipose tissue in type 2 diabetes independent of obesity and possibly involving tumor necrosis factor- α . In *Diabetes* (Vol. 55, pp. 1792-1799). United States.
- de Farias, J. M., Bom, K. F., Tromm, C. B., Luciano, T. F., Marques, S. O., Tuon, T., Silva, L. A., Lira, F. S., de Souza, C. T., & Pinho, R. A. (2013). Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. *Horm Metab Res*, 45(3), 190-196.
- de Ferranti, S., & Mozaffarian, D. (2008). The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. In *Clin Chem* (Vol. 54, pp. 945-955). United States.
- De Pauw, A., Tejerina, S., Raes, M., Keijer, J., & Arnould, T. (2009). Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. In *Am J Pathol* (Vol. 175, pp. 927-939). United States.
- Denis, R. G., Williams, G., & Vernon, R. G. (2003). Regulation of serum leptin and its role in the hyperphagia of lactation in the rat. *J Endocrinol*, 176(2), 193-203.
- Devarakonda, S., Gupta, K., Chalmers, M. J., Hunt, J. F., Griffin, P. R., Van Duyne, G. D., & Spiegelman, B. M. (2011). Disorder-to-order transition underlies the structural basis for the assembly of a transcriptionally active PGC-1 α /ERR γ complex. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 108, pp. 18678-18683). United States.
- Donatto, F. F., Neves, R. X., Rosa, F. O., Camargo, R. G., Ribeiro, H., Matos-Neto, E. M., & Seelaender, M. (2013). Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine*, 61(2), 426-432.
- Duchen, M. R. (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. In *Mol Aspects Med* (Vol. 25, pp. 365-451). England.
- Farias, J. M., Maggi, R. M., Tromm, C. B., Silva, L. A., Luciano, T. F., Marques, S. O., Lira, F. S., de Souza, C. T., & Pinho, R. A. (2012). Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adipoR1-2/APPL1 protein levels in mice. In *Lipids Health Dis* (Vol. 11, pp. 134). England.
- Fernandez-Sanchez, A., Madrigal-Santillan, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-Gonzalez, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I.,

- Sanchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C., & Morales-Gonzalez, J. A. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. In *Int J Mol Sci* (Vol. 12, pp. 3117-3132). Switzerland.
- Fisher-Wellman, K. H., & Neuffer, P. D. (2012). Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. In *Trends Endocrinol Metab* (Vol. 23, pp. 142-153). United States: A 2011 Elsevier Ltd.
- Fontana, L., Eagon, J. C., Trujillo, M. E., Scherer, P. E., & Klein, S. (2007). Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*, 56(4), 1010-1013.
- Frohnert, B. I., Sinaiko, A. R., Serrot, F. J., Foncea, R. E., Moran, A., Ikramuddin, S., Choudry, U., & Bernlohr, D. A. (2011). Increased adipose protein carbonylation in human obesity. In *Obesity (Silver Spring)* (Vol. 19, pp. 1735-1741). United States.
- Fukao, K., Shimada, K., Naito, H., Sumiyoshi, K., Inoue, N., Iesaki, T., Kume, A., Kiyanagi, T., Hiki, M., Hirose, K., Matsumori, R., Ohsaka, H., Takahashi, Y., Toyoda, S., Itoh, S., Miyazaki, T., Tada, N., & Daida, H. (2010). Voluntary exercise ameliorates the progression of atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory effects in apolipoprotein E-deficient mice. In *J Atheroscler Thromb* (Vol. 17, pp. 1226-1236). Japan.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 114(12), 1752-1761.
- Gabriely, I., & Barzilai, N. (2003). Surgical removal of visceral adipose tissue: effects on insulin action. *Curr Diab Rep*, 3(3), 201-206.
- Gaddipati, R., Sasikala, M., Padaki, N., Mukherjee, R. M., Sekaran, A., Jayaraj-Mansard, M., Rabella, P., Rao-Guduru, V., & Reddy-Duvvuru, N. (2010). Visceral adipose tissue visfatin in nonalcoholic fatty liver disease. In *Ann Hepatol* (Vol. 9, pp. 266-270). Mexico.
- Gesta, S., Bluher, M., Yamamoto, Y., Norris, A. W., Berndt, J., Kralisch, S., Boucher, J., Lewis, C., & Kahn, C. R. (2006). Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 103, pp. 6676-6681). United States.
- Gollisch, K. S., Brandauer, J., Jessen, N., Toyoda, T., Nayer, A., Hirshman, M. F., & Goodyear, L. J. (2009). Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. In *Am J Physiol Endocrinol Metab* (Vol. 297, pp. E495-504). United States.
- Goncalves, I. O., Passos, E., Rocha-Rodrigues, S., Diogo, C. V., Torrella, J. R., Rizo, D., Viscor, G., Santos-Alves, E., Marques-Aleixo, I., Oliveira, P. J., Ascensao, A., & Magalhaes, J. (2014). Physical exercise prevents and mitigates non-alcoholic steatohepatitis-induced liver mitochondrial structural and bioenergetics impairments. *Mitochondrion*, 15, 40-51.
- Goncalves, I. O., Passos, E., Rocha-Rodrigues, S., Torrella, J. R., Rizo, D., Santos-Alves, E., Portincasa, P., Martins, M. J., Ascensao, A., & Magalhaes, J. (2014). Physical exercise antagonizes clinical and

- anatomical features characterizing Lieber-DeCarli diet-induced obesity and related metabolic disorders. *Clin Nutr*.
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. In *Nat Rev Immunol* (Vol. 5, pp. 953-964). England.
- Graier, W. F., Malli, R., & Kostner, G. M. (2009). Mitochondrial protein phosphorylation: instigator or target of lipotoxicity? In *Trends Endocrinol Metab* (Vol. 20, pp. 186-193). United States.
- Hajer, G. R., van Haeften, T. W., & Visseren, F. L. (2008a). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*, 29(24), 2959-2971.
- Hajer, G. R., van Haeften, T. W., & Visseren, F. L. (2008b). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. In *Eur Heart J* (Vol. 29, pp. 2959-2971). England.
- Hashimoto, T., Sato, K., & Iemitsu, M. (2013). Exercise-inducible factors to activate lipolysis in adipocytes. In *J Appl Physiol* (1985) (Vol. 115, pp. 260-267). United States.
- Hatano, D., Ogasawara, J., Endoh, S., Sakurai, T., Nomura, S., Kizaki, T., Ohno, H., Komabayashi, T., & Izawa, T. (2011). Effect of exercise training on the density of endothelial cells in the white adipose tissue of rats. In *Scand J Med Sci Sports* (Vol. 21, pp. e115-121). Denmark.
- Hofmann, C., Lorenz, K., Braithwaite, S. S., Colca, J. R., Palazuk, B. J., Hotamisligil, G. S., & Spiegelman, B. M. (1994). Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology*, 134(1), 264-270.
- Hotamisligil, G. S. (1999). Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107(2), 119-125.
- Houstis, N., Rosen, E. D., & Lander, E. S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, 440(7086), 944-948.
- Huang, H., Park, P. H., McMullen, M. R., & Nagy, L. E. (2008). Mechanisms for the anti-inflammatory effects of adiponectin in macrophages. In *J Gastroenterol Hepatol* (Vol. 23 Suppl 1, pp. S50-53). Australia.
- Huang, W., Bansode, R. R., Bal, N. C., Mehta, M., & Mehta, K. D. (2012). Protein kinase Cbeta deficiency attenuates obesity syndrome of ob/ob mice by promoting white adipose tissue remodeling. In *J Lipid Res* (Vol. 53, pp. 368-378). United States.
- Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. In *Obes Rev* (Vol. 11, pp. 11-18). England.
- Irving, B. A., Davis, C. K., Brock, D. W., Weltman, J. Y., Swift, D., Barrett, E. J., Gaesser, G. A., & Weltman, A. (2008). Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. *Med Sci Sports Exerc*, 40(11), 1863-1872.
- Jeong, S., & Yoon, M. (2012). Swimming's prevention of ovariectomy-induced obesity through activation of skeletal-muscle PPARalpha. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 22(1), 1-10.
- Jing, E., Emanuelli, B., Hirschey, M. D., Boucher, J., Lee, K. Y., Lombard, D., Verdin, E. M., & Kahn, C. R. (2011). Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial

- oxidation and reactive oxygen species production. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 108, pp. 14608-14613). United States.
- Kaaman, M., Sparks, L. M., van Harmelen, V., Smith, S. R., Sjolín, E., Dahlman, I., & Arner, P. (2007). Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia*, 50(12), 2526-2533.
- Keller, M. P., & Attie, A. D. (2010). Physiological insights gained from gene expression analysis in obesity and diabetes. *Annu Rev Nutr*, 30, 341-364.
- Kim, B. W., Choo, H. J., Lee, J. W., Kim, J. H., & Ko, Y. G. (2004). Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts. In *Exp Mol Med* (Vol. 36, pp. 476-485). Korea South.
- Kimura, M., Shinozaki, T., Tateishi, N., Yoda, E., Yamauchi, H., Suzuki, M., Hosoyamada, M., & Shibasaki, T. (2006). Adiponectin is regulated differently by chronic exercise than by weight-matched food restriction in hyperphagic and obese OLETF rats. In *Life Sci* (Vol. 79, pp. 2105-2111). England.
- Kizaki, T., Maegawa, T., Sakurai, T., Ogasawara, J. E., Ookawara, T., Oh-ishi, S., Izawa, T., Haga, S., & Ohno, H. (2011). Voluntary exercise attenuates obesity-associated inflammation through ghrelin expressed in macrophages. In *Biochem Biophys Res Commun* (Vol. 413, pp. 454-459). United States: 2011 Elsevier Inc.
- Koh, E. H., Park, J. Y., Park, H. S., Jeon, M. J., Ryu, J. W., Kim, M., Kim, S. Y., Kim, M. S., Kim, S. W., Park, I. S., Youn, J. H., & Lee, K. U. (2007). Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. In *Diabetes* (Vol. 56, pp. 2973-2981). United States.
- Kreier, F., Fliers, E., Voshol, P. J., Van Eden, C. G., Havekes, L. M., Kalsbeek, A., Van Heijningen, C. L., Sluiter, A. A., Mettenleiter, T. C., Romijn, J. A., Sauerwein, H. P., & Buijs, R. M. (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *J Clin Invest*, 110(9), 1243-1250.
- Krishnan, J., Danzer, C., Simka, T., Ukropec, J., Walter, K. M., Kumpf, S., Mirtschink, P., Ukropcova, B., Gasperikova, D., Pedrazzini, T., & Krek, W. (2012). Dietary obesity-associated Hif1alpha activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. In *Genes Dev* (Vol. 26, pp. 259-270). United States.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lagranha, C. J., Deschamps, A., Aponte, A., Steenbergen, C., & Murphy, E. (2010). Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. In *Circ Res* (Vol. 106, pp. 1681-1691). United States.
- Langin, D. (2010). Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? In *Biochim Biophys Acta* (Vol. 1801, pp. 372-376). Netherlands: 2009 Elsevier B.V.

- Laye, M. J., Rector, R. S., Warner, S. O., Naples, S. P., Perretta, A. L., Uptergrove, G. M., Laughlin, M. H., Thyfault, J. P., Booth, F. W., & Ibdah, J. A. (2009). Changes in visceral adipose tissue mitochondrial content with type 2 diabetes and daily voluntary wheel running in OLETF rats. In *J Physiol* (Vol. 587, pp. 3729-3739). England.
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, & D., H. (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 276, 16683-16689.
- Lee, M. J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med*, 34(1), 1-11.
- Lieber, C. S., Leo, M. A., Mak, K. M., Xu, Y., Cao, Q., Ren, C., Ponomarenko, A., & DeCarli, L. M. (2004). Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr*, 79(3), 502-509.
- Liesa, M., Palacin, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. In *Physiol Rev* (Vol. 89, pp. 799-845). United States.
- Lira, F. S., Yamashita, A. S., Rosa, J. C., Koyama, C. H., Caperuto, E. C., Batista, M. L., Jr., & Seelaender, M. C. (2012). Exercise training decreases adipose tissue inflammation in cachectic rats. *Horm Metab Res*, 44(2), 91-98.
- Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H. L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschey, M. D., Bronson, R. T., Haigis, M., Guarente, L. P., Farese, R. V., Jr., Weissman, S., Verdin, E., & Schwer, B. (2007). Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. In *Mol Cell Biol* (Vol. 27, pp. 8807-8814). United States.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 117(1), 175-184.
- Lumini-Oliveira, J., Magalhaes, J., Pereira, C. V., Aleixo, I., Oliveira, P. J., & Ascensao, A. (2009). Endurance training improves gastrocnemius mitochondrial function despite increased susceptibility to permeability transition. In *Mitochondrion* (Vol. 9, pp. 454-462). Netherlands.
- Luo, G. F., Yu, T. Y., Wen, X. H., Li, Y., & Yang, G. S. (2008). Alteration of mitochondrial oxidative capacity during porcine preadipocyte differentiation and in response to leptin. *Mol Cell Biochem*, 307(1-2), 83-91.
- Mahadik, S. R., Lele, R. D., Mehtalia, S. D., Deo, S. S., & Parikh, V. (2013). Regulation of adiponectin secretion in human subcutaneous and omental adipose tissue: effects of pioglitazone and endothelin-1: a pilot study. *J Assoc Physicians India*, 61(4), 244-248.
- Maury, E., & Brichard, S. M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. In *Mol Cell Endocrinol* (Vol. 314, pp. 1-16). Ireland.
- Miyazaki, S., Izawa, T., Ogasawara, J. E., Sakurai, T., Nomura, S., Kizaki, T., Ohno, H., & Komabayashi, T. (2010). Effect of exercise training on

- adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. In *Life Sci* (Vol. 86, pp. 691-698). Netherlands.
- Monteiro, R., Assuncao, M., Andrade, J. P., Neves, D., Calhau, C., & Azevedo, I. (2008). Chronic green tea consumption decreases body mass, induces aromatase expression, and changes proliferation and apoptosis in adult male rat adipose tissue. In *J Nutr* (Vol. 138, pp. 2156-2163). United States.
- Monti, E., Prosperi, E., Supino, R., & Bottiroli, G. (1995). Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by adriamycin in the rat. *Anticancer Res*, 15(1), 193-197.
- Munzberg, H., & Myers, M. G., Jr. (2005). Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. In *Nat Neurosci* (Vol. 8, pp. 566-570). United States.
- Nara, M., Kanda, T., Tsukui, S., Inukai, T., Shimomura, Y., Inoue, S., & Kobayashi, I. (1999). Running exercise increases tumor necrosis factor- α secreting from mesenteric fat in insulin-resistant rats. In *Life Sci* (Vol. 65, pp. 237-244). England.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Hosoya, Y., Yamashita, H., Fujita, H., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., & Sugiura, S. (2007). Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. In *Diabetes* (Vol. 56, pp. 1517-1526). United States.
- Novelli, M., D'Aleo, V., Lupi, R., Paolini, M., Soleti, A., Marchetti, P., & Masiello, P. (2007). Reduction of oxidative stress by a new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a nonobese mouse diabetes model. In *Pancreas* (Vol. 35, pp. e10-17). United States.
- O'Rourke, R. W., White, A. E., Metcalf, M. D., Olivas, A. S., Mitra, P., Larison, W. G., Cheang, E. C., Varlamov, O., Corless, C. L., Roberts, C. T., Jr., & Marks, D. L. (2011). Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia*, 54(6), 1480-1490.
- Oakes, N. D., Kjellstedt, A., Thalen, P., Ljung, B., & Turner, N. (2013). Roles of Fatty Acid oversupply and impaired oxidation in lipid accumulation in tissues of obese rats. *J Lipids*, 2013, 420754.
- Ogasawara, J., Sakurai, T., Kizaki, T., Ishibashi, Y., Izawa, T., Sumitani, Y., Ishida, H., Radak, Z., Haga, S., & Ohno, H. (2012). Higher levels of ATGL are associated with exercise-induced enhancement of lipolysis in rat epididymal adipocytes. In *PLoS One* (Vol. 7, pp. e40876). United States.
- Okamatsu-Ogura, Y., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Terao, A., Kimura, K., & Saito, M. (2011). Possible involvement of uncoupling protein 1 in appetite control by leptin. In *Exp Biol Med (Maywood)* (Vol. 236, pp. 1274-1281). England.
- Oliveira, A. G., Carvalho, B. M., Tobar, N., Ropelle, E. R., Pauli, J. R., Bagarolli, R. A., Guadagnini, D., Carvalheira, J. B., & Saad, M. J. (2011). Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. In *Diabetes* (Vol. 60, pp. 784-796). United States.

- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., Hill, D. E., Vidal, M., Evans, J. G., Thorburn, D. R., Carr, S. A., & Mootha, V. K. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. In *Cell* (Vol. 134, pp. 112-123). United States.
- Palacios, O. M., Carmona, J. J., Michan, S., Chen, K. Y., Manabe, Y., Ward, J. L., 3rd, Goodyear, L. J., & Tong, Q. (2009). Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)*, 1(9), 771-783.
- Park, H., Kaushik, V. K., Constant, S., Prentki, M., Przybytkowski, E., Ruderman, N. B., & Saha, A. K. (2002). Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. In *J Biol Chem* (Vol. 277, pp. 32571-32577). United States.
- Patti, M. E., & Corvera, S. (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. In *Endocr Rev* (Vol. 31, pp. 364-395). United States.
- Pedersen, B. K., & Saltin, B. (2006). Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. In *Scand J Med Sci Sports* (Vol. 16 Suppl 1, pp. 3-63). Denmark.
- Penicaud, L., Cousin, B., Leloup, C., Lorsignol, A., & Casteilla, L. (2000). The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. In *Nutrition* (Vol. 16, pp. 903-908). United States.
- Permana, P. A., Menge, C., & Reaven, P. D. (2006). Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. In *Biochem Biophys Res Commun* (Vol. 341, pp. 507-514). United States.
- Perusse, L., Rice, T., Chagnon, Y. C., Despres, J. P., Lemieux, S., Roy, S., Lacaille, M., Ho-Kim, M. A., Chagnon, M., Province, M. A., Rao, D. C., & Bouchard, C. (2001). A genome-wide scan for abdominal fat assessed by computed tomography in the Quebec Family Study. *Diabetes*, 50(3), 614-621.
- Prieto-Hontoria, P. L., Perez-Matute, P., Fernandez-Galilea, M., Martinez, J. A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2011). Lipoic acid inhibits leptin secretion and Sp1 activity in adipocytes. *Mol Nutr Food Res*, 55(7), 1059-1069.
- Rimessi, A., Giorgi, C., Pinton, P., & Rizzuto, R. (2008). The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. In *Biochim Biophys Acta* (Vol. 1777, pp. 808-816). Netherlands.
- Ringholm, S., Grunnet Knudsen, J., Leick, L., Lundgaard, A., Munk Nielsen, M., & Pilegaard, H. (2013). PGC-1alpha is required for exercise- and exercise training-induced UCP1 up-regulation in mouse white adipose tissue. In *PLoS One* (Vol. 8, pp. e64123). United States.
- Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(12), 885-896.
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. In *Annu Rev Cell Dev Biol* (Vol. 16, pp. 145-171). United States.

- Ruan, H., Hachohen, N., Golub, T. R., Van Parijs, L., & Lodish, H. F. (2002). Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory. *Diabetes*, 51(5), 1319-1336.
- Sadler, N. C., Angel, T. E., Lewis, M. P., Pederson, L. M., Chauvigne-Hines, L. M., Wiedner, S. D., Zink, E. M., Smith, R. D., & Wright, A. T. (2012). Activity-based protein profiling reveals mitochondrial oxidative enzyme impairment and restoration in diet-induced obese mice. In *PLoS One* (Vol. 7, pp. e47996). United States.
- Sakurai, T., Endo, S., Hatano, D., Ogasawara, J., Kizaki, T., Oh-ishi, S., Izawa, T., Ishida, H., & Ohno, H. (2010). Effects of exercise training on adipogenesis of stromal-vascular fraction cells in rat epididymal white adipose tissue. In *Acta Physiol (Oxf)* (Vol. 200, pp. 325-338). England.
- Sakurai, T., Takei, M., Ogasawara, J., Watanabe, N., Sanpei, M., Yoshida, M., Nakae, D., Sakurai, T., Nakano, N., Kizaki, T., Ohno, H., & Izawa, T. (2005). Exercise training enhances tumor necrosis factor- α -induced expressions of anti-apoptotic genes without alterations in caspase-3 activity in rat epididymal adipocytes. In *Jpn J Physiol* (Vol. 55, pp. 181-189). Japan.
- Schaffer, J. E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*, 14(3), 281-287.
- Semple, R. K., Crowley, V. C., Sewter, C. P., Laudes, M., Christodoulides, C., Considine, R. V., Vidal-Puig, A., & O'Rahilly, S. (2004). Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. In *Int J Obes Relat Metab Disord* (Vol. 28, pp. 176-179). England.
- Shi, T., Wang, F., Stieren, E., & Tong, Q. (2005). SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. In *J Biol Chem* (Vol. 280, pp. 13560-13567). United States.
- Shibasaki, M., Takahashi, K., Itou, T., Miyazawa, S., Ito, M., Kobayashi, J., Bujo, H., & Saito, Y. (2002). Alterations of insulin sensitivity by the implantation of 3T3-L1 cells in nude mice. A role for TNF- α ? *Diabetologia*, 45(4), 518-526.
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Ryden, M., Frisen, J., & Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. In *Nature* (Vol. 453, pp. 783-787). England.
- Speretta, G. F., Rosante, M. C., Duarte, F. O., Leite, R. D., Lino, A. D., Andre, R. A., Silvestre, J. G., Araujo, H. S., & Duarte, A. C. (2012). The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics (Sao Paulo)*, 67(12), 1469-1477.
- Suganami T, N. J., Ogawa Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 25(2062-2068).

- Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., Aoe, S., Kamei, Y., & Ogawa, Y. (2007). Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 84-91.
- Sutherland, L. N., Bomhof, M. R., Capozzi, L. C., Basaraba, S. A., & Wright, D. C. (2009). Exercise and adrenaline increase PGC-1{alpha} mRNA expression in rat adipose tissue. In *J Physiol* (Vol. 587, pp. 1607-1617). England.
- Suwa, A., Kurama, T., & Shimokawa, T. (2011). Adipocyte hyperplasia and RMI1 in the treatment of obesity. *FEBS J*, 278(4), 565-569.
- Tchoukalova, Y. D., Votruba, S. B., Tchkonja, T., Giorgadze, N., Kirkland, J. L., & Jensen, M. D. (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. In *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 107, pp. 18226-18231). United States.
- Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. In *Physiol Rev* (Vol. 93, pp. 1-21). United States.
- Valerio, A., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Pisconti, A., Palomba, L., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., Carruba, M. O., & Nisoli, E. (2006). TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest*, 116(10), 2791-2798.
- van den Brandt, J., Kovacs, P., & Kloting, I. (2002). Metabolic syndrome and aging in Wistar Ottawa Karlsburg W rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26(4), 573-576.
- Vieira, V. J., Valentine, R. J., Wilund, K. R., Antao, N., Baynard, T., & Woods, J. A. (2009). Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. In *Am J Physiol Endocrinol Metab* (Vol. 296, pp. E1164-1171). United States.
- Villarroya, J., Giral, M., & Villarroya, F. (2009). Mitochondrial DNA: an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology. In *Obesity (Silver Spring)* (Vol. 17, pp. 1814-1820). United States.
- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerback, S., & Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. In *N Engl J Med* (Vol. 360, pp. 1518-1525). United States: 2009 Massachusetts Medical Society.
- Vonck, J., & Schafer, E. (2009). Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. In *Biochim Biophys Acta* (Vol. 1793, pp. 117-124). Netherlands.
- Wallace, D. C. (2013). A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *J Clin Invest*, 123(4), 1405-1412.
- Wan, Z., Root-McCaig, J., Castellani, L., Kemp, B. E., Steinberg, G. R., & Wright, D. C. (2013). Evidence for the role of AMPK in regulating PGC-1 alpha expression and mitochondrial proteins in mouse epididymal adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*.
- Wang, T., Si, Y. G., Shiriha, O. S., Si, H. Q., Schultz, V., Corkey, R. F., Hu, L. P., Deeney, J. T., Guo, W., & Corkey, B. E. (2010). Respiration in

- Adipocytes is Inhibited by Reactive Oxygen Species. *Obesity*, 18(8), 1493-1502.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. In *J Clin Invest* (Vol. 112, pp. 1796-1808). United States.
- WHO. (2013). *Obesity and overweight*, disponível
- Wilson-Fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicoloso, S., Czech, M., & Corvera, S. (2003). Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*, 23(3), 1085-1094.
- Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M. A., Chui, P. C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M. P., & Corvera, S. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest*, 114(9), 1281-1289.
- Wozniak, S. E., Gee, L. L., Wachtel, M. S., & Frezza, E. E. (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*, 54(9), 1847-1856.
- Yan, L., DeMars, L. C., & Johnson, L. K. (2012). Long-term voluntary running improves diet-induced adiposity in young adult mice. In *Nutr Res* (Vol. 32, pp. 458-465). United States.
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G. W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J. K., Cushman, S. W., Cooney, G. J., Atcheson, B., White, M. F., Kraegen, E. W., & Shulman, G. I. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. In *J Biol Chem* (Vol. 277, pp. 50230-50236). United States.
- Zeyda, M., Farmer, D., Todoric, J., Aszmann, O., Speiser, M., Gyori, G., Zlabinger, G. J., & Stulnig, T. M. (2007). Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. In *Int J Obes (Lond)* (Vol. 31, pp. 1420-1428). England.
- Zeyda, M., & Stulnig, T. M. (2009). Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. In *Gerontology* (Vol. 55, pp. 379-386). Switzerland: 2009 S. Karger AG, Basel.
- Zhang, Y., Marsboom, G., Toth, P. T., & Rehman, J. (2013). Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. In *PLoS One* (Vol. 8, pp. e77077). United States.