UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ATIVIDADE FÍSICA

BRUNO VECCHIATTO

**Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético para a prevenção de
distúrbios metabólicos por meio do treinamento físico aeróbio**

SÃO PAULO

2019

BRUNO VECCHIATTO

Papel da alça ECA2/ANG 1-7/MAS no músculo esquelético para a prevenção de distúrbios metabólicos por meio do treinamento físico aeróbio

Versão original

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Atividade Física.

Área de concentração:

Atividade Física e Saúde

Orientadora:

Profa. Dra. Fabiana de Sant'Anna
Evangelista

SÃO PAULO

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)
CRB 8 - 4936

Vecchiatto, Bruno

Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético para a prevenção de distúrbios metabólicos por meio do treinamento físico aeróbio / Bruno Vecchiatto ; orientadora Fabiana de Sant'Anna Evangelista. – 2019

89 p. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Atividade Física, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Treinamento físico. 2. Músculo esquelético. 3. Angiotensinas. 4. Dieta. I. Evangelista, Fabiana de Sant'Anna, orient. II. Título

CDD 22.ed. – 613.7

Nome: VECCHIATTO, Bruno

Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético para a prevenção de distúrbios metabólicos por meio do treinamento físico aeróbio

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Atividade Física.

Área de concentração:

Atividade Física e Saúde

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr.(a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Témis e Nino, os melhores pais e amigos que alguém poderia ter na vida.

Agradecimentos

Agradeço a FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo pelo apoio e amparo. Processo 2016/20659-5.

Ao professor José Eduardo Krieger e o Laboratório de Genética Cardiomolecular do Instituto do Coração (LGCM), por permitirem a realização do projeto em seu laboratório.

À Dra. Míriam Helena Fonseca-Alaniz, pela amizade, toda ajuda e conselhos.

À Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Caldini- Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, pela colaboração na morfometria mitocondrial.

Aos meus queridos colegas: Cynthia, Anna Laura, Marília, Luis e Daniela, por todas as aventuras e trabalho em equipe.

À Letícia, por todas as discussões e debates sobre ciência e sociedade.

Aos meus pais, por todo apoio e carinho.

À Profa. Fabiana de Sant'anna Evangelista. Agradeço toda a orientação, broncas, paciência, confiança, tolerância e ajuda. Obrigado do fundo do meu coração.

RESUMO

VECCHIATTO, Bruno. **Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético para a prevenção de distúrbios metabólicos por meio do treinamento físico aeróbio**. 2019. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Versão original.

A alça do sistema renina angiotensina (SRA) composto pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), angiotensina 1-7 (Ang 1-7) e o receptor Mas (ECA2/Ang 1-7/Mas) está associada com a redução da adiposidade, aumento da sensibilidade à insulina e da captação de glicose. Nesse estudo, investigamos a associação da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético com a prevenção de distúrbios metabólicos por meio do treinamento físico aeróbio (TFA). Camundongos C57BL6/J foram separados em grupos sedentário e dieta normocalórica (SED-NO, n=10); treinado e dieta normocalórica (TF-NO, n=9); sedentário e dieta de cafeteria (SED-CAF, n=9); e treinado e dieta de cafeteria (TF-CAF, n=10). O TFA consistiu em 60 min de corrida a 60% da velocidade máxima, 5x/semana por 8 semanas. Os grupos treinados apresentaram menor massa corporal após o TFA. No teste de esforço máximo, o grupo TF-NO aumentou significativamente o $VO_{2máx}$, e ambos os grupos treinados apresentaram maior velocidade e tempo, maior intensidade na qual o $VO_{2máx}$ foi atingido e menor custo relativo de corrida. No músculo sóleo, os grupos treinados aumentaram a atividade das enzimas citrato sintase e β -HAD, o grupo TF-CAF apresentou mitocôndrias na região subsarcolemal com danos mais severos comparado ao TF-NO, e o SED-CAF reduziu mitocôndrias intermiofibrilares com danos moderados comparado ao SED-NO. Não houve diferença na expressão dos genes Tfam, NRF-1 e COX II, de proteínas de dinâmica mitocondrial e na alça ECA2/Ang 1-7/Mas nos músculos sóleo e gastrocnêmio. Em conclusão, o TFA preveniu o aumento da massa corporal induzido pela dieta de cafeteria, melhorou a capacidade aeróbia e promoveu aumento na atividade de enzimas oxidativas no músculo sóleo. Entretanto, as adaptações induzidas pelo TFA não foram associadas com a modulação da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Treinamento físico aeróbio (TFA). Angiotensina 1-7. Dieta de cafeteria

ABSTRACT

VECCHIATTO, Bruno. **The role of ACE2/Ang 1-7/Mas axis on skeletal muscle on the prevention of metabolic diseases by aerobic exercise training.** 2019. 89 p. Dissertation (Master of Science) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2019. Original version.

The renin angiotensin axis is composed by the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), angiotensin 1-7 (Ang1-7) and receptor Mas (ACE2/Ang1-7/Mas) is associated with lowering adiposity, higher insulin sensitivity and glucose uptake. In this study we investigated the association of ACE2/Ang1-7/Mas axis on skeletal muscle for the prevention of metabolic disturbance by the aerobic endurance training (AET). Mice C57BL6/J were separated in sedentary group and chow diet (C, n=10); trained and chow diet (T, n=9); sedentary and cafeteria diet (CAF, n=9) and the trained group with cafeteria diet (CAFT, n=10). The AET consisted of 60 minutes of running at 60% of the maximal velocity, 5x/wk for eight weeks. The trained groups had lower body mass after AET. On maximal effort test, T group increased significantly the VO_{2max} , and both trained groups presented higher velocity and time, higher velocity when VO_{2max} was achieved and lower relative running cost. On soleus muscle, trained groups increased the enzymatic activity of citrate synthase and β -had. CAFT group presented the mitochondria on the subsarcolemmal area with more severe damages when compared to T group, and the CAF group presented lower moderate damage in intermyofibrillar area when compared to C group. There were no differences on Tfam, NRF-1 and COXII gene expression, on mitochondrial dynamics protein expression and on the ACE2/Ang1-7/Mas axis on soleus and gastrocnemius muscles. In conclusion, the AET prevented the increase in body mass induced by cafeteria diet, improved the aerobic capacity and promoted the increase in oxidative enzymes activity on soleus muscle. However, the adaptations induced by AET were not associated with ACE2/Ang1-7/Mas modulation on skeletal muscle.

Keywords: Skeletal muscle. Aerobic exercise training (AET). Angiotensin 1-7. Cafeteria diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Componentes e ações do sistema renina angiotensina	25
Figura 2 -	Ações metabólicas da Ang II e da Ang 1-7	26
Figura 3 -	Volume de oxigênio consumido durante teste de esforço máximo	42
Figura 4 -	Volume de gás carbônico produzido durante teste de esforço máximo	43
Figura 5 -	Cinética do consumo de oxigênio (VO_2) e produção de gás carbônico (VCO_2) durante teste de esforço físico máximo	44
Figura 6 -	Cinética do quociente respiratório durante teste de esforço máximo	44
Figura 7 -	Cinética do quociente respiratório (QR) durante teste de esforço e indicação do limiar anaeróbio (AT)	45
Figura 8 -	Cinética do custo relativo da corrida durante teste incremental máximo até a exaustão	46
Figura 9 -	Cinética da taxa de oxidação de carboidratos durante teste de esforço até a exaustão	46
Figura 10 -	Cinética da taxa de oxidação de lipídios durante teste de esforço até a exaustão	47
Figura 11 -	Cinética da oxidação de carboidratos e lipídios durante teste de esforço até a exaustão	47
Figura 12 -	Atividade das enzimas citrato sintase e β -HAD no músculo sóleo	48
Figura 13 -	Expressão proteica de Mfn1 no músculo sóleo	48
Figura 14 -	Expressão proteica de Mfn2 no músculo sóleo	49
Figura 15 -	Expressão proteica de Drp1 no músculo sóleo	49

Figura 16 -	Micrografias com aumento de 6200x utilizadas para análise de conteúdo mitocondrial no músculo sóleo	50
Figura 17 -	Dimensão mitocondrial no espaço subsarcolemal e no espaço intermiofibrilar do músculo sóleo	51
Figura 18 -	Formato mitocondrial no espaço subsarcolemal e no espaço intermiofibrilar do músculo sóleo	51
Figura 19 -	Micrografias com aumento de 8900x utilizadas para análise de dimensão e formato mitocondrial no músculo sóleo	51
Figura 20 -	Micrografias com aumento de 39.000X utilizadas para análise de integridade de crista mitocondrial	52
Figura 21 -	Atividade enzimática da ECA2 no músculo sóleo	53
Figura 22 -	Concentração de Ang 1-7 no músculo sóleo	53
Figura 23 -	Expressão proteica do receptor Mas no músculo sóleo	54
Figura 24 -	Atividade das enzimas citrato sintase e β -HAD no músculo gastrocnêmio	55
Figura 25 -	Expressão proteica da Mfn1 no músculo gastrocnêmio	55
Figura 26 -	Expressão proteica da Mfn2 no músculo gastrocnêmio	56
Figura 27 -	Expressão proteica da Drp1 no músculo gastrocnêmio	56
Figura 28 -	Atividade enzimática da ECA2 no músculo gastrocnêmio	57
Figura 29 -	Concentração de Ang1-7 no músculo gastrocnêmio	57
Figura 30 -	Expressão proteica do receptor Mas no músculo gastrocnêmio	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Primers utilizados na amplificação dos genes	36
Tabela 2 -	Massa corporal, peso de tecidos e órgãos	39
Tabela 3 -	Parâmetros metabólicos em repouso	40
Tabela 4 -	Parâmetros metabólicos no teste de esforço físico até a exaustão	41
Tabela 5 -	Conteúdo de mitocôndrias no músculo sóleo	50
Tabela 6 -	Integridade mitocondrial	52
Tabela 7 -	Expressão de mRNA no músculo gastrocnêmio	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
CTE	Cadeia de transporte de elétron
CPLI	Cadeia promotora leve
CPP	Cadeia promotora pesada
CPT-1	Carnitinapalmitoil transferase 1
PGC1- α	Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
mtDNA	DNA mitocondrial
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA 2	Enzima conversora de angiotensina 2
NRF-1	Fator de respiração nuclear 1
Tfam	Fator de transcrição mitocondrial A
IKK β	Fator nuclear kappa beta quinase
PI3-K	Fosfadilinositol 3-quinase
Pi	Fosfato inorgânico
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
AMPK	Proteína atividade por AMP
Akt	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PDK	Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos
Drp1	Proteína relacionada dinamina 1
FATB	Proteína transportadora de ácido graxo
SIRT 1	Sirtuína 1
SRA	Sistema renina angiotensina

TAB	Tecido adiposo branco
IRS	Tirosinas de substratos proteicos
GLUT -4	Transportadores de glicose N°4
TFA	Treinamento físico aeróbio
β-HAD	β-hidroxiacil-coa desidrogenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Rotas metabólicas no músculo esquelético	17
2.2 Capacidade oxidativa e doenças metabólicas	22
2.3 O SRA e os efeitos biológicos	24
2.4 Os efeitos metabólicos do TFA	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4 METODOLOGIA	30
4.1 Amostra	30
4.2 Dietas alimentares	30
4.3 Protocolo de treinamento físico aeróbio (TFA)	31
4.4 Teste de esforço físico máximo	31
4.5 Calorimetria indireta	31
4.6 Avaliação da massa corporal	33
4.7 Procedimento de morte e coletas	34
4.8 Dosagens enzimáticas	34
4.9 Expressão gênica	35
4.10 Expressão proteica	36
4.11 Quantificação de Ang 1-7	37
4.12 Morfometria mitocondrial	37
4.13 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	38
5.1 Massa corporal e peso do tecido muscular	38
5.2 Avaliações metabólicas	39
5.3 Respostas no músculo sóleo	48
5.3.1 Atividade de enzimas oxidativas	48
5.3.2 Dinâmica Mitocondrial	48
5.3.3 Morfometria Mitocondrial	50

5.3.4 Alça ECA2/Ang 1-7/Mas	53
5.4 Respostas no músculo gastrocnêmio	54
5.4.1 Expressão gênica	54
5.4.2 Atividade de enzimas oxidativas	55
5.4.3 Dinâmica Mitocondrial	55
5.4.4 Alça ECA2/Ang 1-7/Mas	56
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de obesidade, resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) pode ser decorrente do estilo de vida dos indivíduos, caracterizado por reduzido gasto energético e elevada ingestão de alimentos ricos em gorduras saturadas e carboidratos com alto índice glicêmico (BOECKNER; PULLEN; WALKER, 2006; GARBER et al., 2011; WEERATUNGA et al., 2014; WILLIAMS et al., 2015). A prevenção da obesidade e do DM2 tem sido cada vez mais preconizada mundialmente não apenas em função da elevada prevalência nas populações, mas também devido às complicações em órgãos alvos, tais como coração, vasos e rins, que podem resultar no aumento da morbidade e mortalidade (AIELLO et al., 2015). Segundo os dados do inquérito de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas (VIGITEL, 2017), a prevalência de obesidade e de diabetes em indivíduos adultos é de 18,9% e 7,6% no Brasil, respectivamente. Se comparado com os dados de 10 anos atrás, o aumento da prevalência foi de 42,1% para a obesidade e 31% para o diabetes. Esses dados são alarmantes e sinalizam a necessidade urgente de ações preventivas e terapêuticas para esses distúrbios metabólicos. A investigação dos mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento e na progressão das doenças metabólicas tem contribuído diretamente para a descoberta de potenciais alvos terapêuticos. Nesse contexto, os estudos envolvendo o sistema renina angiotensina (SRA) merecem destaque em decorrência da associação entre as ações da angiotensina II (Ang II) e a patogênese da obesidade e do DM2 (NIELSEN et al., 2010; TABONY; YOSHIDA; SUKHANOV, 2012; MARCUS; SHEFER; STERN, 2013). A hiperatividade da alça do SRA composta pela enzima conversora de angiotensina (ECA), o peptídeo Ang II e o receptor AT1 (ECA/Ang II/AT1) é prejudicial para o controle metabólico tecidual. No músculo esquelético, a Ang II está envolvida no desenvolvimento de resistência à insulina e na proteólise muscular através do aumento na produção de citocinas inflamatórias, de espécies reativas de oxigênio e inativação da proteína ativada por AMP (AMPK), uma das principais proteínas reguladoras do metabolismo energético tecidual (MUÑOZ; GIANI; DOMINICI, 2010; TABONY; YOSHIDA; SUKHANOV, 2012; BAYLE, 2013).

Outra alça do SRA que inclui a ECA2 (enzima homóloga a ECA, que converte Ang II em Ang 1-7), o peptídeo Ang 1-7 e o receptor Mas (ECA2/Ang 1-7/Mas)

(DONOGHUE, 2000; TIPNIS, 2000; SANTOS; SIMOES E SILVA; MARIA, 2003), também tem sido investigada no contexto das doenças metabólicas e cardiovasculares. Tanto a expressão do receptor Mas quanto da ECA2 foram identificados em diversos tecidos, incluindo músculo esquelético, tecido adiposo branco (TAB), fígado e rim (PAIZIS et al., 2005; PRASANNARONG; SANTOS; HENRIKSEN, 2012; ZIMMERMAN; BURNS, 2012; MARCUS; SHEFER; STERN, 2013). As ações da Ang 1-7 são opostas as ações da Ang II, incluindo a vasodilatação, a resposta anti-proliferativa e a anti-hipertrófica (FERRARIO; TRASK; JESSUP, 2005; SANTOS; FRÉZARD; FERREIRA, 2005; LAZARTIGUES; FENG; LAVOIE, 2007). Sob o ponto de vista metabólico, a Ang 1-7 promove aumento da lipólise (OH; KIM; PARK, 2012), redução da adiposidade e melhora do perfil lipídico (SANTOS et al., 2007), atenuação das manifestações da síndrome metabólica, aumento da captação de glicose e redução do estresse oxidativo (LIU et al., 2012), aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético (PRASANNARONG; SANTOS; HENRIKSEN, 2012; ECHEVERRÍA-RODRÍGUEZ; DEL VALLE-MONDRAGÓN; HONG, 2014) e melhora no metabolismo ósseo (ABUHASHISH et al., 2017). Esses dados indicam que a alça do SRA ECA2/Ang 1-7/Mas pode representar um alvo terapêutico para reduzir a obesidade e o DM2 (ECHEVERRÍA-RODRÍGUEZ; DEL VALLE-MONDRAGÓN; HONG, 2014; CHHABRA et al., 2016).

O treinamento físico aeróbio (TFA) tem sido amplamente recomendado para a prevenção e o tratamento de doenças metabólicas por induzir adaptações em tecidos metabolicamente ativos responsáveis pelo aumento da sensibilidade à insulina, melhora do metabolismo oxidativo, controle de peso corporal e da adiposidade (RABOL et al., 2011; HIGA et al., 2014a; SWIFT; JOHANNSEN; LAVIE, 2015). Dados na literatura demonstraram que parte das respostas benéficas do TFA pode ser mediada pela redução da alça ECA/Ang II/AT1 sistêmica e tecidual (WILLIAMS; RAYSON; JUBB, 2000; MOUSA; LIU; CORNISH, 2008; FERNANDES; HASHIMOTO; OLIVEIRA, 2010; CIAMPIONE et al., 2011). No entanto, até o presente momento, os efeitos do TFA sobre a alça ECA2/Ang 1-7/Mas foram insuficientemente explorados sob o ponto de vista metabólico no músculo esquelético e, uma lacuna de conhecimento existe sobre a associação dessa alça do SRA com a prevenção de distúrbios metabólicos por meio do TFA. Diante do exposto, o presente estudo foi delineado para investigar a associação da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo

esquelético com a prevenção de distúrbios metabólicos por meio do TFA. A hipótese testada foi de que as adaptações induzidas pelo TFA no músculo esquelético que contribuem para a prevenção da obesidade e da resistência à insulina estão associadas com a ativação da alça ECA2/Ang 1-7/Mas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Rotas metabólicas no músculo esquelético

O tecido muscular esquelético tem como função primordial realizar movimentos. Por existir em grande quantidade e estar quase sempre ativo, sua demanda metabólica é alta, o que influencia amplamente o estado energético do organismo (IIZUKA; MACHIDA; HIRAFUJI, 2014; HOPKINS; BLUNDELL, 2016). Tanto o processo de síntese quanto de utilização de ATP podem ser modulados de acordo com a quantidade de trabalho desempenhada por esse tecido (KELLEY, 2005)

Para ser utilizada como fonte de energia, a glicose deve ser captada pelo músculo esquelético através da ação da insulina. A insulina é um hormônio formado por duas cadeias peptídicas que são ligadas uma a outra por pontes de dissulfeto. É produzida nas células β pancreáticas, nas ilhotas de Langerhans, armazenada em vesículas secretórias no aparelho de Golgi, e liberada na corrente sanguínea quando o aumento na concentração de glicose é percebido pelas células β pancreáticas (CURI; PROCOPIO, 2017; SILVERTHORN, 2017). O receptor específico de insulina é uma tirosina quinase que tem duas subunidades α , extracelulares, e duas subunidades β , localizadas no espaço transmembrana, ligadas por pontes dissulfeto. Embora existam duas subunidades α , somente uma se ligará à insulina enquanto a outra perderá a sensibilidade, fenômeno denominado cooperativismo negativo. Uma vez ligada à insulina, a subunidade β adquire atividade quinase, alterando a conformação e se autofosforilando, o que leva também a fosforilação de tirosinas de substratos proteicos (IRS). Existem vários tipos de IRS, mas os mais expressos nos tecidos de mamíferos são o IRS-1 e IRS-2, que se ligam em sítios específicos de moléculas homólogas a Src2, como a fosfadilinositol 3-quinase (PI3-K). A PI3-K ativada promove a interação entre a proteína quinase dependente de fosfoinosítídeos (PDK) e a proteína quinase B (Akt). Essa interação desencadeia a fosforilação/ativação da Akt levando à translocação das vesículas contendo

transportadores de glicose do músculo esquelético (GLUT-4) do citosol para a membrana celular (CURI; PROCOPIO, 2017; SILVERTHORN, 2017)

Embora a insulina seja o principal hormônio responsável pelo estímulo da captação de glicose em tecidos metabolicamente ativos, mudanças nas vias de sinalização intracelulares independente da insulina moduladas pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) também podem contribuir para essa resposta (O'NEILL; HOLLOWAY; STEINBERG, 2013). A AMPK é uma molécula heterotrimérica que contém uma subunidade catalítica (α), com duas isoformas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), e duas subunidades regulatórias (β e γ), com as seguintes isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$) (MUSI et al., 2005). Sua ativação é feita através da fosforilação do resíduo de tirosina 172 localizado na subunidade α sempre que ocorrer um decréscimo no nível energético celular determinado pelo aumento na relação AMP-ATP ou decréscimo da creatina-fosfocreatina (SANDERS et al., 2007). Quando fosforilada, a AMPK estimula a captação de glicose via fosforilação do substrato da Akt 160 (AS160) (SAKAMOTO; HOLMAN, 2008) e conseqüente translocação de GLUT4, tanto no músculo esquelético (LIM; KOLA; KORBONITS, 2010) quanto no tecido adiposo (GAIDHU; CEDDIA, 2011). Além disso, a AMPK fosforila a acetil-CoA carboxilase (ACC) no resíduo serina 79, forma na qual a atividade é inibida. Por catalisar a reação de formação do malonil-CoA, a inativação da ACC reduz a concentração de malonil-CoA, resultando em diminuição da inibição da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1), uma importante proteína transportadora de ácido graxo para dentro da mitocôndria (DE PÁDUA et al., 2009).

Dentro da célula muscular, a glicose deverá ser metabolizada pelo processo denominado glicólise. Nesse processo, serão consumidos 2 ATPs e produzidas 2 NADHs e 4 ATPs até que sejam formados 2 piruvatos. Em condições de demanda energética proporcional a produção energética, o piruvato entrará na mitocôndria através da piruvato translocase, passando pelo Ciclo de Krebs. Assim, o piruvato será convertido em acetil-CoA por descarboxilação oxidativa, realizada pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase, produzindo 2 NADHs. O acetil-CoA será metabolizado no Ciclo de Krebs, onde será condensado ao oxaloacetato à citrato por ação da enzima citrato sintase, em uma reação irreversível, cuja atividade é tradicionalmente utilizada como marcadora de efeito de treinamento físico aeróbio (SIU et al., 2003; MURIAS et al., 2011; BISHOP; GRANATA; EYNON, 2014). O citrato

formado sofrerá o processo de isomerização, realizado pela aconitase, formando isocitrato. Assim, reações subsequentes acontecerão no Ciclo de Krebs até a formação novamente do oxaloacetato, onde sua concentração é fator limitante para continuidade do ciclo e consequente formação de acetil-CoA. Cada Ciclo de Krebs formará 3 NADH, 1 FADH₂ e 1 GTP (MARZZOCO; TORRES, 1999; NELSON, DAVID L.COX, 2002).

Os lipídios participam de forma muito intensa na produção de energia no organismo, tanto em repouso quanto durante o exercício de longa duração e baixa intensidade. O triacilglicerol é composto de uma molécula de glicerol e três ácidos graxos (AG). Sua quebra ocorre com ação hormonal através da lipase hormônio sensível, onde o glicerol será liberado na corrente sanguínea e metabolizado no fígado, formando glicerol-3-fosfato pela enzima glicerol quinase (MARZZOCO; TORRES, 1999). Para ser oxidado, o AG é transportado para dentro das células através do auxílio da CD36 e da proteína transportadora de AG (FATB). Uma vez dentro da célula, o AG é acilado com a Coenzima A, formando acil-CoA pela acil-CoA sintetase (ACS), consumindo 2 ATP. Então, o acil-CoA é transformado em acil-carnitina pela ação da CPT1, enzima chave para a entrada do AG na mitocôndria, e depois é direcionado para a β -oxidação (EATON; BARTLETT; POURFARZAM, 1996; CURI et al., 2003). Na β -oxidação, uma das enzimas chaves do processo é a β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD), que também é tradicionalmente utilizada como marcadora de metabolismo aeróbio e oxidação de ácidos graxos (YANG; HE; SCHULZ, 2005; VISHWANATH, 2016). Os produtos da β -oxidação são acetil-CoA, NADH e FADH₂, sendo que o primeiro seguirá para o Ciclo de Krebs e as coenzimas seguirão para a cadeia de transporte de elétrons (CTE) (EATON; BARTLETT; POURFARZAM, 1996; MARZZOCO; TORRES, 1999; NELSON, DAVID L.COX, 2002; CURI et al., 2003).

As moléculas de NADH produzidas durante o Ciclo de Krebs serão utilizadas para a doação de elétrons na CTE e consequente produção de ATP e H₂O (ALBERTS; ALEXANDER; DAVID, 2017). Os elétrons passarão por três grandes complexos de enzimas respiratórias e pela ATP sintase, acoplados à crista mitocondrial. No primeiro complexo, denominado NADH desidrogenase, a molécula de NADH será oxidada gerando dois elétrons, um próton e um NAD⁺. Os elétrons do NADH serão transferidos por um mononucleotídeo de flavina e oito grupos de ferro-enxofre para o carreador

ubiquinona. As moléculas de FADH_2 produzidas na β -oxidação e no Ciclo de Krebs também fornecerão seus elétrons para a CTE, mas a sua transferência ocorrerá com sua oxidação e a consequente redução da ubiquinona. A ubiquinona reduzida, seja pelo NADH ou pelo FADH_2 , denominada ubiquinol, transferirá os elétrons para o complexo citocromo redutase, que novamente passará o elétron para outra molécula, a citocromo c, reduzindo-a e transferindo o elétron para o complexo citocromo c oxidase. No final, os elétrons serão transferidos do citocromo c para moléculas de oxigênio, formando H_2O .

A passagem de elétrons pelos complexos promove um gradiente de prótons, expelindo-os através de bombas para fora da matriz, tornando o lado da matriz negativo enquanto o lado da crista se torna positivo. Então, por meio da alteração de pH e de potencial de membrana, um gradiente eletroquímico é criado e os prótons retornam para o lado da matriz mitocondrial, agora positivo. Assim, o gradiente de prótons fará com que a enzima ATPsintase rotacione em seu eixo, conformando suas proteínas com sítios de $\text{ADP} + \text{Pi}$, propelindo à formação do ATP (ALBERTS; ALEXANDER; DAVID, 2017).

No músculo esquelético, a mitocôndria é particularmente importante para a manutenção dos níveis de ATP necessários para a contração muscular. Além disso, a habilidade de modular a transição da oxidação de substratos energéticos (lipídeos e carboidratos) depende da capacidade oxidativa da mitocôndria (PATTI; CORVERA, 2010).

Tendo em vista o conhecimento básico da metabolização dos substratos energéticos no músculo esquelético, está claro que as mitocôndrias são organelas fundamentais para os processos oxidativos e para ampla produção de energia. Sob o ponto de vista estrutural, o DNA mitocondrial (mtDNA) se encontra na matriz. Suas bases estão relacionadas com a estrutura mitocondrial, a CTE e a fosforilação oxidativa. Embora esteja claro que a mitocôndria tem o próprio DNA e estabelece sua relação com núcleo celular através de fatores transcripcionais, cofatores também influenciam a síntese de proteínas. Por exemplo, o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma ($\text{PGC1-}\alpha$) aumenta a expressão de genes relacionados à respiração celular através da ligação ao fator de respiração nuclear 1 (NRF-1) e não diretamente em regiões promotoras do mtDNA (SCARPULLA, 2002; BAAR, 2004). Assim, o NRF-1 liga-se nas áreas promotoras do mtDNA, onde há o

comando da expressão de citocromo C oxidase. Além disso, o NRF-1 está também envolvido na replicação de mtDNA, ligando-se a fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), uma proteína de aproximadamente 25 kDa codificada no núcleo e transcrita no citosol da célula como uma pré-proteína que atuará dentro da matriz mitocondrial, onde a sequência será clivada para formar a proteína ativa (SCARPULLA, 2006; THEILEN; KUNKEL; TYAGI, 2017).

Embora proteína e mtDNA sejam facilmente degradados, o complexo que une os dois (mtDNA e Tfam), o nucleoide mitocondrial, não é, o que protege o genoma mitocondrial. Desta forma, a transcrição do genoma se dá com a ligação nas regiões promotoras denominadas cadeia promotora leve (CPL) e cadeia promotora pesada (CPP). Ligações com regiões específicas do mtDNA permitem que o Tfam interaja com a maquinaria de transcrição, influenciando a síntese de proteínas (THEILEN; KUNKEL; TYAGI, 2017).

A mitocôndria é capaz de alterar a sua forma e tamanho através dos processos de fusão e fissão. O processo de fissão é fundamental para garantir a saúde, função e a adaptação à demanda energética imposta às mitocôndrias. Dessa forma, atua para eliminar fragmentos mitocondriais danificados, induzir a morte celular, permitir que um grande número de células se desenvolva e promover a mobilidade dentro da célula (MCCARRON et al., 2013). Na fissão, a proteína Drp1 atua formando espirais em volta da mitocôndria através de receptores em sua membrana externa. Aparentemente, o retículo endoplasmático atua direcionando o local onde haverá a fissão ou mesmo enovelando-se em torno da mitocôndria e gerando tensão, facilitando o contato da Drp-1 (MCCARRON et al., 2013 ; LEE; YOON, 2016).

O processo de fusão entre duas mitocôndrias atua facilitando a troca, o contato do DNA mitocondrial e a manutenção do potencial elétrico, permitindo uma melhor adaptação às demandas energéticas e expandindo o tamanho da organela (ROY et al., 2015). Além disso, o processo de fusão está associado com melhoras na CTE e quando é bloqueado, há maior produção de espécies reativas de oxigênio (LAHERA et al., 2017). A fusão é controlada por proteínas como mitofusina 1 e 2 (Mfn 1 e 2) que participam na fase inicial da fusão, e a proteína optic atrophy 1 (OPA1). A Mfn1 e a Mfn2 conectam as duas mitocôndrias e após esse processo, torna-se necessário que as membranas externas se fundam através da hidrólise de GTP (MCCARRON et al., 2013; LEE; YOON, 2016). Dessa forma, para o funcionamento saudável do

metabolismo mitocondrial, é necessário que a fissão e fusão mitocondrial ocorram de forma balanceada (FEALY et al., 2014; IQBAL; HOOD, 2015).

2.2 Capacidade oxidativa e doenças metabólicas

A perda da habilidade em lidar com o excesso de lipídios no organismo é reconhecida como um dos principais gatilhos para o desenvolvimento de doenças metabólicas. Mesmo em indivíduos saudáveis, a infusão de lipídios tem o potencial de aumentar a insulina plasmática depois de algumas horas. Em indivíduos e animais diabéticos, observa-se aumento no fluxo de ácidos graxos para o músculo esquelético, (HEGARTY et al., 2002; BONEN; PAROLIN; STEINBERG, 2004) no entanto, em decorrência de prejuízos na capacidade oxidativa, acabam sendo armazenados no tecido. O excesso de lipídios e intermediários, como ceramidas e diacilglicerol, reduz a habilidade da insulina em promover fosforilação dos seus receptores de membrana IRS1 e IRS2, resultando em menor captação de glicose pelo músculo esquelético (SHULMAN, 2000; HUANG et al., 2018), aumenta a formação de metabólitos como acil-CoA, que também interferem na via de sinalização da insulina, ativa proteínas quinases como a proteína quinase C (PKC) e fator nuclear kappa beta quinase (IKK β), os quais induzem a produção de TNF- α e IL-6, e participam, portanto, do desenvolvimento da resistência à insulina e DM2 (RANDLE, 1998; DELARUE; MAGNAN, 2007).

Prejuízos na atividade de proteínas reguladoras do metabolismo energético estão diretamente associados com a redução da capacidade oxidativa do músculo esquelético. Sob o ponto de vista funcional, a redução na capacidade de oxidar lipídios e produzir energia no músculo esquelético é diretamente proporcional à disfunção mitocondrial observada em indivíduos diabéticos (ZELEZNIAK et al., 2010). De fato, Veitenhansl et al. (2004) mostraram que filhos de pais diabéticos resistentes à insulina apresentavam uma taxa de síntese de ATP 30% menor do que indivíduos jovens saudáveis. Kelley et al. (2002) mostraram que mitocôndrias extraídas do músculo de indivíduos diabéticos apresentaram redução na fosforilação oxidativa via redução da NADH oxidase e da citrato sintase.

Alterações funcionais e morfológicas da mitocôndria têm sido apontadas como um dos principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças

metabólicas (PATTI; CORVERA, 2010; SIVITZ; YOREK, 2010). Na obesidade e no DM2, observa-se redução na atividade da proteína AMPK (FUJII et al., 2008), que é chave para o estímulo do catabolismo de lipídios e inibição da lipogênese; redução do cofator de transcrição PGC1- α , fundamental para a ativação da expressão de genes mitocondriais, e que pode ser ativado pela AMPK e sirtuina 1 (SIRT1) (DUNCAN et al., 2007); redução na atividade das enzimas citrato sintase e β -HAD e, por consequência, prejuízos para o Ciclo de Krebs e β -oxidação (SONG et al., 2012; KOH et al., 2019).

Danos na dinâmica mitocondrial oriundos do desbalanço entre a fissão (controlada pela Drp 1) e a fusão (controlada pelas mitofusinas 1 e 2) mitocondrial estão associados com a obesidade e o DM2 (MITSUHASHI et al., 2011; YOON et al.; 2011). De fato, Bach et al. (2003) mostraram que a redução da Mfn2 está associada com a redução da capacidade oxidativa no músculo de indivíduos e animais obesos. Em animais submetidos a dietas ricas em gorduras, a expressão de Mfn2 parece estar diminuída, prejudicando a fusão (PATTANAKUHAR et al., 2019). Jheng et al. (2011) mostraram melhora na sensibilidade à insulina no músculo de camundongos obesos após inibição da fissão mitocondrial por meio farmacológico. Esses dados revelam que alterações estruturais na mitocôndria podem refletir em menor capacidade de produção energética do músculo esquelético.

Sob o ponto de vista morfológico, estudos associaram a disfunção mitocondrial com doenças metabólicas. Bonnard et al. (2008) identificaram inchaço e desalinhamento da crista mitocondrial no músculo esquelético de animais alimentados com dieta hipercalórica. Chomentowski et al. (2011) observaram redução no número de mitocôndrias no músculo esquelético de indivíduos obesos. Em pacientes obesos e diabéticos, o tamanho de mitocôndrias pode ser reduzido quando comparado com sujeitos magros (KELLEY et al; 2002). Entre os principais mecanismos responsáveis pelos prejuízos morfofuncionais mitocondriais, foram descritas reduções do PGC1- α , dos fatores de transcrição NRF-1 e 2, e do fator de transcrição Tfam (WU et al., 1999; DUNCAN et al., 2007).

Em síntese, os achados na literatura revelam que a redução da capacidade oxidativa decorrente da disfunção mitocondrial no músculo esquelético está associada com o desenvolvimento e progressão de doenças metabólicas, portanto, melhorar o

metabolismo oxidativo no músculo esquelético é fundamental para a prevenção e o tratamento de tais doenças.

2.3 O SRA e os efeitos biológicos

O SRA é composto por proteínas e hormônios peptídicos que integram uma sequência de reações químicas iniciadas a partir da clivagem do angiotensinogênio, produzido principalmente no fígado, embora seu mRNA seja expresso em vários tecidos (Figura 1). A renina é uma enzima proteolítica produzida nas células granulares das arteríolas aferentes do aparelho justaglomerular dos néfrons, que é responsável pela clivagem do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). O aumento na secreção de renina é dependente da queda da pressão da perfusão renal, diminuição da concentração de NaCl na parte distal dos túbulos próximos das células justaglomerulares, estímulo simpático e *feedback* negativo da presença de Ang II nas células justaglomerulares (ATLAS, 2007).

Uma vez formada, a Ang I é clivada em Ang II através da ação da ECA (HERICHOVA, I. SZANTOOVA, 2013; LU et al., 2016). A Ang II exerce os efeitos biológicos através dos receptores AT1 e AT2. A ativação do AT1 resulta em aumento da pressão arterial, contração da musculatura lisa de vasos, produção e liberação de aldosterona, liberação de vasopressina no cérebro por ação de seus receptores no hipotálamo, aumento da sede e reabsorção de sódio no túbulo proximal (HERICHOVA, I. SZANTOOVA, 2013; SILVERTHORN, 2017). Por outro lado, a ativação dos receptores AT2 induz vasodilatação, regeneração tecidual e atividade anti-inflamatória (MATAVELLI; SIRAGY, 2015).

Segundo a literatura, a alça do SRA era formado pela ECA/Ang II/AT1, no entanto, outros componentes do SRA foram posteriormente descobertos, tais a como a ECA2, a Ang 1-7 e o receptor Mas, os quais formam a alça SRA ECA2/Ang 1-7/Mas. A Ang 1-7 pode ser formada à partir da ação de ECA2 em Ang II, pela ação de ECA 2 em Ang I, formando Ang 1-9, que será clivada em Ang1-7 por ação de ECA ou uma endopeptidase neutra (JIANG et al., 2014). Produzida também em vários tecidos, a Ang1-7 liga-se ao receptor Mas, acoplado a proteína G, exercendo efeitos opostos aos da Ang II, tais como vasodilatação, anti-proliferação e anti-inflamação (Figura 1).

FIGURA 1. Componentes e ações do sistema renina angiotensina. NEP= endopeptidase neutra.

A associação entre os prejuízos metabólicos no músculo esquelético e o SRA tem sido investigada na literatura. A Ang II parece limitar a captação de glicose devido ao efeito inibitório sobre a fosforilação da Akt (OGIHARA et al., 2002). Tabony et al. (2012) mostraram que a Ang II induz danos metabólicos significativos e perda de massa muscular via inativação da AMPK. Além disso, a Ang II inativa o PGC-1 α e reduz a fosforilação da ACC, tornando-a ativa, condição na qual induz maior síntese de malonil-CoA. Nesta condição, a oxidação de ácidos graxos pode ser reduzida, uma vez que o malonil-CoA inibe a atividade da proteína transportadora de ácido graxo na mitocôndria CPT-1. Os efeitos inibitórios sobre a AMPK e o PGC-1 α são revertidos após a administração de AICAR, um ativador farmacológico da AMPK (TABONY; YOSHIDA; SUKHANOV, 2012). Além disso, o bloqueio de receptores AT1 em animais tratados com dieta rica em gordura induz menor ganho de peso corporal quando comparados ao grupo controle, mostrando que a ativação desses receptores pode estar relacionada com ganho de peso corporal (SMITH et al., 2014).

Enquanto a Ang II está envolvida no desenvolvimento e progressão dos danos metabólicos, a Ang 1-7 pode aumentar a captação de glicose *in vivo* estimulada pela insulina no músculo esquelético através da fosforilação de IRS-1 e Akt (ECHEVERRÍA-RODRÍGUEZ; DEL VALLE-MONDRAGÓN; HONG, 2014). Outros

achados reforçam as ações metabólicas da Ang 1-7, como por exemplo, a melhora do efeito inibitório da Ang II sobre o transporte de glicose no músculo esquelético via ação da Ang 1-7 através do receptor Mas (PRASANNARONG; SANTOS; HENRIKSEN, 2012), a reversão dos prejuízos na sinalização da insulina em músculo esquelético de ratos alimentados com frutose através da administração subcutânea de Ang 1-7 (GIANI et al., 2009), e a melhora na fosforilação da Akt em músculo esquelético, TAB e fígado após a infusão de Ang 1-7 (MUÑOZ; GIANI; DOMINICI, 2010). O papel da via também pode ser observado na prevenção da atrofia muscular uma vez que animais tratados com LPS (lipopolissacarídeo), indutor de atrofia, tem o efeito bloqueado com a utilização de Ang1-7 e restaurado com A779, o antagonista do receptor Mas (MORALES et al., 2015).

Em conjunto, pode-se observar que os efeitos da Ang II e da Ang1-7 são opostos, e o balanço entre as duas alças do SRA tem sido estudado nas condições patológicas (MUÑOZ et al., 2012; CISTERNAS et al., 2015). A figura 2 resume os efeitos metabólicos antagônicos da Ang II e da Ang 1-7 que podem estar relacionados com a indução ou prevenção da obesidade e da resistência à insulina.

FIGURA 2. Ações metabólicas da Ang II e da Ang 1-7 que podem aumentar ou reduzir o risco de desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina.

Os estudos até então reportados sugerem que o uso de intervenções capazes de ativar a alça ECA2/Ang 1-7/Mas pode contribuir para melhorar o transporte de

glicose no músculo esquelético, e conseqüentemente, prevenir e tratar a resistência à insulina e o DM2. No entanto, considerando que os danos no metabolismo oxidativo e o acúmulo lipídios interferem na sinalização da insulina, uma lacuna de conhecimento existe sobre a associação da alça ECA2/Ang 1-7/Mas com a capacidade oxidativa do músculo esquelético e uma possível contribuição para a prevenção de distúrbios metabólicos. Além disso, pouco se sabe sobre a relação entre a Ang 1-7 e a função mitocondrial no músculo esquelético, e possíveis repercussões para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos.

2.4 Os efeitos metabólicos do TFA

O TFA promove diversas adaptações metabólicas que favorecem diretamente a oxidação de lipídios como fonte de energia, contribuindo para a redução da adiposidade corporal em seres humanos (BERGMAN et al., 1999), em camundongos alimentados com dieta de cafeteria (HIGA et al., 2014a; MULLER et al., 2018; AMÉRICO et al., 2019), em camundongos obesos (EVANGELISTA et al., 2015). Além disso, sabe-se que o TFA reduz processos inflamatórios (SAMAAN et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2016), diminui a glicemia de jejum e a incidência de DM2 em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos (MALIN; KIRWAN, 2012). Essas respostas podem ser atribuídas à maior sensibilidade à insulina, maior tolerância à glicose e maior expressão de GLUT4, independente de alteração peso corporal (SAMAAN et al., 2014; GURLEY; GRIESEL; OLSON, 2015).

No músculo esquelético, o TFA promove aumento no fluxo de ácidos graxos para a mitocôndria (KIM; LIM, 2016), melhora na função mitocondrial, melhora na atividade das enzimas citrato sintase (HIGA et al., 2012; MAZZUCATTO et al., 2014), β -HAD e citocromo C oxidase (WOJEWODA et al., 2015). Quanto ao efeito do TFA sobre a dinâmica mitocondrial, Perry et al. 2010 observaram melhora na função mitocondrial no músculo esquelético através do aumento da expressão de mtDNA, Mfn2, Tfam e NRF-2. Esse efeito soma-se à melhora na atividade das enzimas oxidativas (BREARLEY; ZHOU, 2001; BAAR, 2004). Além disso, o TFA induz angiogênese (MALEK et al., 2013) e maior conteúdo de fibras tipo 1 (ROCKL et al., 2007). Em conjunto, todas essas adaptações são fundamentais para aumentar a capacidade aeróbia (CONNOR et al., 2015; LECKA-CZERNIK; ROSEN, 2015), a qual

está intimamente relacionada com a qualidade e expectativa de vida (MAZZEO et al., 1998; NETZ et al., 2011; REIMERS; KNAPP; REIMERS, 2012). De fato, tanto o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) quanto o consumo de oxigênio pico (VO_{2pico}), que são bons indicadores de qualidade e expectativa de vida (ARAÚJO; HERDY; STEIN, 2013), aumentam após o TFA (CASABURI; STORER; BEN-DOV, 1987).

O efeito protetor do TFA contra doenças metabólicas tem sido amplamente estudado pelo nosso grupo de pesquisa. Por meio do mesmo modelo experimental alimentado com dieta de cafeteria utilizado no presente estudo, demonstramos que o TFA previne a obesidade e a resistência à insulina, e que as adaptações metabólicas encontradas no tecido adiposo branco que favorecem a oxidação dos ácidos graxos ao invés do armazenamento, são responsáveis, pelo menos em parte, pelos benefícios gerados pelo TFA (HIGA et al., 2014a). Posteriormente, demonstramos que o TFA previne o aumento de deposição lipídica no rim dos camundongos alimentados com dieta de cafeteria (MULLER et al., 2018), e mais recentemente, publicamos que a dieta de cafeteria bloqueia o efeito termogênico induzido pelo TFA no tecido adiposo branco subcutâneo, e que a modulação parcial dos componentes do SRA neste depósito não estaria associado com o efeito protetor do TFA contra a obesidade e a resistência à insulina (AMÉRICO et al., 2019). Sabendo que a capacidade metabólica do músculo esquelético é crucial para a melhora da oxidação lipídica e que, o TFA exerce amplo efeito sobre o músculo esquelético, o passo seguinte para entender os mecanismos de prevenção induzidos pelo TFA foi a investigação do músculo esquelético nos animais alimentados com dieta de cafeteria.

Os efeitos do TFA sobre os componentes do SRA e as possíveis repercussões para a prevenção e o tratamento de doenças são relativamente recentes na literatura. No fígado de animais submetidos a dieta rica em frutose, o TFA foi capaz de diminuir os níveis de Ang II, aumentar os níveis de Ang1-7, diminuir a atividade de ECA e normalizar os valores de receptor Mas e AT1 (FRANTZ et al., 2017a).

O bloqueio de receptores AT1 em camundongos alimentados com dieta rica em gordura induz menor pressão arterial sistólica em relação ao grupo controle, menor quantidade de aldosterona sérica, maior VO_{2pico} relativo, menor concentração de lactato depois do teste de esforço. Interessante que esses animais conseguem correr por mais tempo e distância, e realizam mais trabalho que sedentários alimentados

com dieta rica em gordura (TAKADA et al., 2013). Além disso, o bloqueio da atividade de ECA em ratos submetidos ao TFA aumenta o tempo até exaustão em teste de esforço físico quando comparado aos animais sedentários e treinados, possivelmente em função da redução na formação de Ang II e diminuição na degradação de bradicinina (HABOUZIT et al., 2009).

Animais deficientes em ECA2 apresentam menor tolerância ao esforço físico, maior composição corporal, menor hipertrofia cardíaca e de músculo esquelético e, menor expressão gênica de MAS e AT2 no ventrículo esquerdo (MOTTA-SANTOS et al., 2016). Além disso, o TFA tem o potencial de aumentar as concentrações de Ang1-7 no coração semelhante à administração oral de Ang1-7, resultando em menor pressão sistólica (BERTAGNOLLI et al., 2014). Além disso, o TFA consegue reduzir as concentrações de Ang II no ventrículo esquerdo de animais espontaneamente hipertensos (SILVA et al., 2017). Em conformidade com os estudos anteriores, parte dos efeitos benéficos do TFA é inibido em animais *knockout* do receptor Mas (GUIMARÃES et al., 2012). Coletivamente, os achados na literatura demonstram diversos efeitos do TFA sobre o SRA, no entanto, novos estudos são necessários para revelar o papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas nas adaptações metabólicas induzidas pelo TFA.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a associação da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético com a prevenção de distúrbios metabólicos por meio do TFA.

3.2 Específicos

Estudar em camundongos sedentários e treinados, alimentados com dieta controle e de cafeteria:

- O peso corporal e o metabolismo energético de repouso e no exercício físico máximo;

- O potencial do metabolismo oxidativo do músculo esquelético;
- A dinâmica e a morfometria mitocondrial;
- Os componentes da alça do SRA ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostra

Foram utilizados camundongos machos adultos C57BL/6 (n=38) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os camundongos foram separados aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com o tipo de dieta (normocalórica - NO ou de cafeteria - CAF) e tratamento (sedentário - SED ou submetido ao treinamento físico - TF): sedentário-normocalórica (SED-NO, n=10), treinado-normocalórica (TF-NO, n=9), sedentário-cafeeteria (SED-CAF, n=9), treinado-cafeeteria (TF-CAF, n=10). Todos os animais foram mantidos em local com temperatura ambiente entre 22- 24°C. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Todos os procedimentos seguiram as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP, protocolo número 001/2016.

4.2 Dietas alimentares

A dieta hipercalórica (cafeteria) foi preparada com 10g de chocolate ao leite derretido, 15g da ração convencional triturada, 10g de amendoim torrado triturado, 5g de bolacha de maisena triturada e 5g de açúcar refinado. Essa dieta é eficaz para induzir resistência à insulina e aumento de adiposidade, conforme demonstrado em recente estudo do nosso grupo (HIGA et al., 2014b) A dieta controle foi feita através da ingestão da ração industrializada padrão (Nuvilab, Paraná, Brasil).

4.3 Protocolo de treinamento físico aeróbio (TFA)

O protocolo de TFA foi realizado em esteira rolante, 5 vezes por semana, durante 8 semanas. As sessões de treinamento tiveram intensidade de 60% da velocidade máxima (mensurada durante o teste de esforço físico máximo). A duração foi progressivamente aumentada, iniciando com 30 minutos na primeira semana e atingindo 60 minutos na quarta semana, conforme descrito previamente (FERREIRA; ROLIM; BARTHOLOMEU, 2007). Essa duração de treinamento foi mantida até o término do protocolo. Os camundongos sedentários foram submetidos à caminhada na esteira, 3 vezes por semana, durante 5 minutos. Esse procedimento se faz necessário para evitar qualquer interferência do estresse gerado pela esteira.

4.4 Teste de esforço físico máximo

A capacidade de execução de exercício físico foi avaliada pré-TFA, na 4ª semana de TFA e pós-TFA através de um teste progressivo escalonado em esteira rolante, sem inclinação, até a exaustão (FERREIRA; ROLIM; BARTHOLOMEU, 2007). A velocidade inicial da esteira foi de 0,4 km/h, e a cada três minutos, a velocidade da esteira foi aumentada em 0,2 km/h até atingir a exaustão. Os testes pré-TFA e da 4ª semana de TFA foram realizados na esteira rolante de treinamento físico. O teste pós-TFA foi realizado na esteira rolante acoplada ao sistema de calorimetria para as avaliações metabólicas. Enquanto na esteira de treinamento físico, a exaustão do animal foi definida pela interrupção do padrão de corrida e contato com o fundo da divisória da esteira por 10 segundos, na esteira da calorimetria, a exaustão foi caracterizada pelo contato contínuo de qualquer parte do corpo do animal com a grade de choque por 5 segundos (PETROSINO et al., 2016). O teste da 4ª semana de TFA foi realizado somente nos grupos treinados para reajuste na velocidade de treino.

4.5 Calorimetria indireta

A taxa metabólica de repouso dos animais foi determinada através da avaliação do consumo de oxigênio por calorimetria indireta (Panlab, Barcelona, Espanha) após

o período de TFA. Para a adaptação ao protocolo, os animais foram colocados na esteira por 15 minutos durante os dois dias que antecederam o teste. Para a avaliação em repouso, o animal foi submetido a jejum de 2 horas previamente, e mantido no sistema durante 5 minutos para adaptação. Posteriormente, foram registrados o consumo de oxigênio (VO_2 , ml/min/kg), a produção de gás carbônico (VCO_2 , ml/min/kg), o coeficiente respiratório (QR) e o gasto energético (kcal/dia/kg) pelo programa Metabolism® (Oxylet System, Panlab, Barcelona, Espanha) durante 45 minutos. Para o cálculo do VO_2 , VCO_2 , QR, gasto energético, oxidação de lipídios e de carboidratos durante o repouso, foram considerados os 5 últimos minutos da avaliação em repouso (BROOKS; WHITE, 1978)

Em seguida, o animal foi submetido ao teste de esforço físico utilizando o protocolo descrito anteriormente (tópico 4.4). Foram registrados o VO_2 (ml/min/kg), o VCO_2 (ml/min/kg), o QR e o gasto energético (kcal/dia/kg). Após a obtenção dos resultados, foram calculados o $\text{VO}_{2\text{máx}}$ (ml/min/kg) e $\text{VCO}_{2\text{máx}}$ (ml/min/kg) a partir dos valores médios obtidos durante o último estágio do teste de esforço; o VO_2 pico (ml/min/kg) foi considerado o maior valor segundo-segundo de VO_2 obtido no último estágio (EVANGELISTA et al., 2005); o $i\text{VO}_2$ (Km/h) foi definido como a intensidade de exercício correspondente ao $\text{VO}_{2\text{máx}}$ (MACHADO; CAPUTO; DENADAI, 2004). No $\text{VO}_{2\text{máx}}$ também foram determinados o gasto calórico (kcal/kg/min), a oxidação de carboidratos (mg/kg/min) e a oxidação de lipídios (mg/kg/min). Adicionalmente, o limiar anaeróbio foi determinado a partir do aumento abrupto da cinética do QR (WASSERMAN; MCILROY, 1964; PETROSINO et al., 2016), enquanto o custo relativo da corrida foi definido como a porcentagem do $\text{VO}_{2\text{máx}}$ mensurado nas cargas submáximas do exercício físico e, o $\text{VO}_{2\text{reserva}}$ como o delta entre o $\text{VO}_{2\text{máx}}$ e o VO_2 de repouso.

Os valores absolutos de VO_2 , VCO_2 e gasto energético foram calculados de acordo com as seguintes equações:

Onde:

$$VO_2 = \frac{(F \times [O_2]_e) - [O_2]_s \times F \times (1 - [O_2]_e/100)}{(1 - [O_2]_s/100 - [CO_2]_s/100)}$$

$$VCO_2 = \frac{F \times (1 - [O_2]_e/100)}{(1 - [O_2]_s/100 - [CO_2]_s/100)} \times [CO_2]_s - [CO_2]_e \times F$$

$$\text{Gasto energético} = [3,815 + (1,232 \times RQ)] \times VO_2 \times 1,44$$

$[O_2]_e$ = concentração de oxigênio inicial

$[O_2]_s$ = concentração de oxigênio dentro da caixa

$[CO_2]_e$ = concentração de dióxido de carbono inicial

$[CO_2]_s$ = concentração de dióxido de carbono dentro da caixa

F = fluxo de ar

RQ = coeficiente respiratório

Para o cálculo da iVO_2 (Km/h), foi utilizada a fórmula: $iVO_2 = \text{velcom} + (t/180) \times 0,2$ km/h (MACHADO; CAPUTO; DENADAI, 2004), onde:

Velcom = Velocidade do último estágio concluído.

t= tempo que permaneceu no último estágio não-concluído.

180 = Tempo de duração de cada estágio.

0,2 = Taxa de incremento da velocidade a cada estágio.

As taxas de oxidação de carboidratos (mg/kg/min) e de lipídios (mg/kg/min) foram calculadas através das equações descritas por Ferrannini, (1988)

Oxidação de carboidratos: $Cox = (4,55 \times VO_2) - (3,21 \times VCO_2)$

Oxidação de lipídios: $Lox = (1,67 \times VO_2) - (1,67 \times VCO_2)$

4.6 Avaliação da massa corporal

Ao longo de todo protocolo experimental, o peso da massa corporal foi realizado semanalmente em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil). A determinação do ganho de massa corporal semanal dos animais foi

calculada pela diferença entre a massa corporal final (semana 8) e a massa corporal inicial (semana 0).

4.7 Procedimento de morte e coletas

Os animais foram submetidos ao procedimento de morte 48 horas após a última sessão de TFA. Para isso, os animais permaneceram 8 horas em jejum e em seguida foram anestesiados por injeção i.p. de pentobarbital sódico (4mg /100g de peso corporal). No momento em que o animal não demonstrou sinais de reflexo nas patas traseiras, foi feita a pesagem em balança digital, e em seguida, foi iniciada a coleta do sangue através de punção na veia cava inferior. Finalmente, foram coletados e pesados os músculos esqueléticos das patas (gastrocnêmio, sóleo e plantar).

4.8 Dosagens enzimáticas

Para a dosagem da atividade enzimática de β -HAD e de citrato sintase, amostras dos músculos sóleo (15mg/300 μ L) e gastrocnêmio (50mg/500 μ L) foram suspensas em tampão de extração contendo Tris-base (50mM) e EDTA (1mM), pH=7,4. O material mantido em gelo, foi homogeneizado em Polytron (PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucene, Suíça) por 10 segundos em velocidade máxima e depois centrifugado (3000 rpm, 15 minutos, 4°C). Em seguida, o sobrenadante foi retirado para a dosagem da atividade da β -HAD e da citrato sintase através de ensaio colorimétrico realizado em espectrofotômetro, segundo método descrito por Bass et al. (1969) e Alp et al. (1976), respectivamente.

Para a β -HAD, 40 μ L do sobrenadante de sóleo foram encubados em 230 μ L de tampão de ensaio, constituído de Trietanolamina-HCl (100mM, pH=7,0), NADH (0,45mM) e EDTA (5mM), a 37°C por 5 minutos. Enquanto para gastrocnêmio, foram encubados 10 μ L de sobrenadante e 275 μ L de tampão de ensaio também a 37°C por 5 minutos. A reação foi iniciada com a adição 30 μ L de acetoactil-CoA (0,1mM) ao extrato enzimático de sóleo e 15 μ L no extrato enzimático de gastrocnêmio, sendo acompanhada durante 10 minutos (37°C). A absorbância foi monitorada a 340nm. Para análise da cinética enzimática de citrato sintase, foram utilizados 10 μ L dos homogenatos das amostras e 275 μ L de mistura de ensaio, constituído de Tris Base

(100mM), 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzoic acid (DTNB, 0,2mM), Triton 0,1%, acetil-CoA 1mg, e pH 8,1, e foram encubados a 25 °C. Após estabilização por 5 min, a reação foi iniciada com a adição de 15 µL de ácido oxaloacético (0,5mM) ao extrato enzimático, e acompanhada por 10 minutos (25°C). A absorbância foi monitorada a 412 nm, sendo o coeficiente de extinção para este comprimento de onda igual a 13,6. As proteínas foram quantificadas pelo método BCA™ (PIERCE Biotechnology). Os resultados foram expressos em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína presente no extrato.

A atividade da enzima ECA2 foi avaliada em músculo esquelético através da utilização de peptídeos fluorescentes (ARAUJO et al., 2000; FERNANDES; HASHIMOTO; MAGALHÃES, 2011). Para extração, o músculo sóleo foi homogeneizado na proporção 15mg/300µL de tampão enquanto o músculo gastrocnêmio foi extraído na proporção 50mg/500 µL de tampão. Em seguida, foram centrifugados a 3000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado para os ensaios. Para a dosagem da ECA2, foi usado o peptídeo Abz-APK(Dnp)-OH em 0.2 M de tampão Tris-HCl, 200 mM of NaCl, pH 7.5. Para testar a especificidade do ensaio da ECA2, foi utilizado 0,1 µM de DX600, um inibidor específico da ECA2. As proteínas no tecido foram quantificadas pelo kit de ensaio proteico BCA™ (PIERCE Biotechnology). A atividade foi expressa em UF/min/mg de proteína tecidual.

4.9 Expressão gênica

O RNA total foi extraído do músculo esquelético usando o reagente TRIzol®, de acordo com as especificações técnicas do produto (Invitrogen® Life Technologies, USA). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e através da quantificação em espectrofotômetro em 260 e 280nm. Foram utilizadas apenas as amostras cuja razão 260/280nm for maior que 1,8. O cDNA foi sintetizado utilizando Superscript III RNase H-RT (Invitrogen® Life Technologies, USA) a 42°C durante 50 min. Os primers utilizados para amplificação dos genes alvos estão descritos na TABELA 1. A avaliação da expressão gênica foi realizada através de PCR em tempo real (RT-PCR) e as amplificações foram avaliadas através do sistema de detecção ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando o reagente SYBR Green Master Mix (Applied

Biosystems). A expressão foi normalizada com níveis de GAPDH como uma referência endógena.

TABELA 1. Primers utilizados na amplificação dos genes.

Gene	Forward	Reverse
Tfam	5'-GAAGGGAATGGGAAAGGTAGA-3'	5'-AACAGGACATGGAAAGCAGAT-3'
NRF-1	5'-GACAAGATCATCAACCTGCCTGTAG-3'	5'-GCTCACTTCCTCCGGTCCTTTG-3'
COXII	5'-GCCGACTAAATCAAGCAACA-3'	5'-CAATGGGCATAAAGCTATGG-3'
GAPDH	5'- AGGAGCGAGACCCCACTAAC-3'	5'- TTGGTTCACACCCATCACAA-3'

4.10 Expressão proteica

Para o ensaio de *Western Blot*, as amostras de sóleo e gastrocnêmio foram homogeneizadas em tampão na proporção tecido/tampão de 15mg/300µL e 50mg/500µL respectivamente. O tecido foi homogeneizado em tampão contendo 1mM EDTA, 1mM EGTA, 5mM Kc, 2mM MgCl₂ e 25mM de Hepes. Foram utilizados inibidores de fosfatase C2 e C3 na proporção 1:300, inibidor de protease P na proporção 1:300 e PMSF na proporção 1:1000 (Sigma). Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°. Depois, foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante coletado. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinar a concentração de proteína através do kit BCA™ (PIERCE Biotechnology), e parte foi armazenada a -80°C para posteriores análises por *Western Blot*.

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-Mas diuído 1,25:1000, anti-Mnf1, anti-Mnf 2 e anti- Drp-1, todos com diluição de 1:2000 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Além disso, foi utilizado anticorpo secundário goat anti-rabbit marcado com HRP (Invitrogen, New York, USA) (1:3000 em solução de leite desnatado a 5%), e como normalizador anticorpos para beta-actina e GAPDH (Abcam, Cambridge, USA). O sinal na membrana foi detectado através da reação da peroxidase na solução de ECL durante exposição no equipamento Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare Lifescience®). A intensidade das bandas foi quantificada no programa Image J (versão 1.43 para Windows).

4.11 Quantificação de Ang 1-7

Os níveis de Ang 1-7 foram avaliados no músculo esquelético por meio de ELISA utilizando kit comercial (Biomatik, Wilmington, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Parte do sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína pelo kit BCA™ (PIERCE Biotechnology). Os resultados foram apresentados como pg/mL/ug de proteína.

4.12 Morfometria mitocondrial

Para a análise mitocondrial, as amostras foram fixadas em solução de 2,5% glutaraldeído em 0,1M cacodilato de sódio (pH 7,3) durante 24h. Em seguida, os tecidos foram pós-fixados em 1% tetróxio de ósmio e 1,5% ferrocianeto de potássio em 0,1M cacodilato de sódio (pH 7,3) durante 90 minutos a 4°C. Em seguida, os tecidos foram desidratados em séries de diferentes concentrações de álcool a 4-20°C, infiltradas com mistura de óxido de propileno e Epon a 20°C e embebidos em 100% Epon a 30°C. Seções ultrafinas (cerca de 150nm) foram cortadas e contrastadas com acetato de uranilo e citrato de chumbo e examinadas e fotografadas em microscópio eletrônico. A região subsarcolemal (SS) foi definida como o espaço entre a membrana sarcoplasmática e a primeira fibra muscular. A região intermiofibrilar (IMF) foi considerada como a região entre a primeira fibra muscular e toda a área subsequente da célula.

Para a análise de conteúdo mitocondrial, foram fotografadas cinco imagens de sóleo de cada animal, randomicamente, com aumento de 6.200X. As imagens foram avaliadas através do método de contagem de pontos (grade quadrada de 336 pontos) no Image J (versão 1.43 para Windows), de acordo com Nielsen et al. (2010). O conteúdo mitocondrial foi considerado como a proporção de pontos que incidiram sobre mitocôndrias relativa aos espaços SS e IMF avaliados.

Para as análises quantitativas de cada mitocôndria, foram utilizadas fotografias com aumento de 8.900X, de acordo com Devries et al. (2013) e Picard et al. (2013). A dimensão das mitocôndrias foi determinada circundando cada mitocôndria e sua área foi calculada através do Image J (versão 1.43 para Windows), sendo expressa

em μM^2 . Para a análise da forma das mitocôndrias, foi utilizada a razão entre o maior e o menor eixo calculados por meio de uma elipse criada pelo software

Para a análise qualitativa, as imagens foram fotografadas com aumento de 39.000X. Foram atribuídas notas de 0 a 4 para classificar o inchaço da crista e a integridade da membrana externa de cada mitocôndria, segundo método proposto por Kloner et al. (1978). A média da frequência das notas para cada grupo foi categorizada de acordo com o grau do dano: sem dano (nota 0), dano moderado (notas 1 e 2), e dano severo (notas 3 e 4).

4.13 Análise estatística

Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média e foram comparados através de análise de variância de um fator ou dois (ANOVA), conforme necessidade. Na presença de diferença estatística significativa, foi utilizado o pós-teste de Tukey. Em todos os casos foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Massa corporal e peso do tecido muscular

Os animais começaram o protocolo experimental com massas corporais sem diferença estatística (Tabela 2). Entretanto, a massa corporal final e o ganho de massa foram significativamente menores no grupo TF-NO comparados aos grupos sedentários. Embora o grupo TF-CAF apresente menor magnitude de ganho de massa corporal comparado ao grupo SED-CAF, essa diferença não foi estatística. Já no final das 8 semanas, observamos que o grupo TF-CAF apresentou massa corporal significativamente menor comparado ao grupo SED-CAF, mostrando que o TFA foi capaz de prevenir o aumento da massa corporal induzido pela dieta de cafeteria no grupo TF-CAF. Não houve diferença estatística no peso dos músculos plantar e sóleo no final das 8 semanas de TFA, entretanto, o peso do músculo gastrocnêmio foi maior no grupo TF-NO comparado ao grupo SED-CAF (Tabela 2).

TABELA 2. Massa corporal, peso de tecidos e órgãos

	SED-NO (n=10)	TF-NO (n=9)	SED-CAF (n=9)	TF-CAF (n=10)
MC Inicial (g)	17,56±0,8	18,86±0,4	19,83±0,6	19,13±0,6
MC Final (g)	26,84±0,3	23,93±0,48*	28,79±1,0	25,47±0,4 [#]
Ganho de MC (g)	9,280± 0,8	5,078±0,6*	8,956±1,2	6,340±0,7
Gastrocnêmio (mg/g)	0,0112± 0,0003	0,0119± 0,0005 [#]	0,0102± 0,0004	0,0112± 0,0002
Plantar (mg/g)	0,0018±0,0001	0,0017±0,0001	0,0017±0,0001	0,0017±0,0001
Sóleo (mg/g)	0,0013±0,0001	0,0013±0,0001	0,0012±0,0001	0,0013±0,0001

MC= massa corporal. Os dados estão apresentados na forma de média ± erro padrão.

*p<0,05 vs. SED-NO e SED-CAF; [#]p<0,05 vs. SED-CAF.

5.2 Avaliações metabólicas

A tabela 3 demonstra os dados de calorimetria observados durante o repouso dos animais. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para as variáveis VO₂, VCO₂, QR, gasto energético, oxidação de carboidratos e oxidação de lipídios entre os grupos estudados.

TABELA 3. Parâmetros metabólicos em repouso.

	SED-NO (n=10)	TF-NO (n=9)	SED-CAF (n=8)	TF-CAF (n=8)
VO ₂ (ml/min/kg)	48,68± 1,54	39,78± 2,43	49,56±13,2	41,54± 4,17
VCO ₂ (ml/min/kg)	34,03± 1,38	27,17± 2,14	33,33±9,81	28,32± 3,10
QR	0,70± 0,01	0,68± 0,02	0,67±0,03	0,68± 0,01
GE (Kcal/dia/kg)	315,79± 17,45	266,74± 16,80	323,33±57,2	278,46± 18,09
Oxidação de CHO (mg/min/ kg)	112,23± 3,81	93,79± 5,94	118,50±29,29	98,09± 9,26
Oxidação de LIP (mg/min/kg)	24,46± 1,26	21,06± 1,90	27,10±6,32	22,07± 2,00

VO₂= consumo de oxigênio; VCO₂= produção de gás carbônico; QR=quociente respiratório; GE= Gasto energético; CHO= carboidrato; LIP= lipídio.

Conforme demonstrado na tabela 4, no teste de esforço físico até a exaustão, tanto o tempo máximo para atingir a exaustão quanto a velocidade máxima atingida foram maiores nos grupos treinados comparados ao grupo SED-CAF. Além disso, o grupo TF-NO alcançou valores mais altos que o grupo SED-NO em ambas as variáveis. Em relação ao VO₂máx, os animais do grupo TF-NO atingiram valores maiores que os animais sedentários e valores maiores de VO₂ pico quando comparados ao grupo SED-CAF. Embora o grupo TF-CAF tenha obtido um VO₂máx 8,6% maior que o grupo SED-CAF, essa diferença não foi estatisticamente diferente. Já o valor de VCO₂máx foi maior no grupo TF-NO comparado aos grupos sedentários.

A iVO₂, ou seja, a intensidade na qual o VO₂máx foi atingido, foi significativamente maior nos grupos treinados comparado ao grupo SED-CAF, e maior no TF-NO comparado ao grupo SED-NO. Não foram observadas diferenças significativas no QR, na oxidação de carboidratos e lipídios entre os grupos. No entanto, o gasto energético apresentado no VO₂máx e a 60% da velocidade máxima foram significativamente maiores no grupo TF-NO comparado aos grupos SED-NO e SED-CAF. O VO₂reserva foi significativamente maior nos grupos treinados comparados ao SED-NO (Tabela 4).

TABELA 4. Parâmetros metabólicos no teste de esforço físico até a exaustão.

	SED-NO (n=10)	TF-NO (n=9)	SED-CAF (n=8)	TF-CAF (n=8)
Tempo máx. (min)	31,44±6,18	38,22±6,22 ^{*#}	29,50±2,83	36,88±1,64 [*]
Vel. máx. (cm/s)	52,33±10,46	64,44±11,42 ^{*#}	49,00±6,09	62,25±2,31 [*]
VO ₂ máx (ml/min/kg)	53,61±6,08	60,28±5,13 ^{*#}	53,12±5,45	57,77±5,24
VO ₂ pico (ml/min/kg)	56,44±6,15	62,78±5,37 [*]	55,24±5,39	60,03±5,25
iVO ₂ (km/h)	1,86±0,41	2,30±0,42 ^{*#}	1,73±0,17	2,23±0,11 [*]
VCO ₂ máx (ml/min/kg)	42,44±5,15	48,05±4,06 ^{*#}	42,20±2,72	45,78±3,22
QR máx	0,79±0,05	0,80±0,06	0,80±0,07	0,79±0,04
GE no VO ₂ máx (Kcal/min/Kg)	369,79±41,56	416,39±32,67 ^{*#}	366,70±33,13	398,56±33,60
CHO -VO ₂ máx (mg/kg/min)	107,70±15,81	120,02±19,55	106,25±20,64	115,89±16,54
LIP -VO ₂ max (mg/kg/min)	18,66±5,14	20,42±7,48	18,24±7,27	20,02±5,37
GE 60% Vel. Max. (Kcal/min/Kg)	221,88±24,94	249,84±19,60 ^{*#}	220,02±19,88	239,14±20,16
VO ₂ reserva (ml/min/kg)	5,58±2,25	20,50±3,09 [#]	11,58±2,05	16,23±2,91 [#]

VO₂máx= consumo máximo de oxigênio; VO₂pico= consumo de oxigênio pico; iVO₂= intensidade correspondente ao VO₂máx; VCO₂máx= produção máxima de gás carbônico; QR= quociente respiratório; GE= gasto energético; VO₂reserva= consumo de oxigênio de reserva; CHO= carboidrato; LIP= lipídio. *p≤0,05 vs. SED-CAF; #p≤0,05 vs. SED-NO.

A figura 3 apresenta o volume de oxigênio consumido ao longo do teste de esforço físico. Embora haja ausência de diferença estatística no momento em que o $VO_{2\text{máx}}$ é atingido, ao longo do teste de esforço os animais treinados permanecem mais tempo em teste e com maiores velocidades, o que comprova o efeito do TFA no aumento da capacidade para realizar exercícios em uma intensidade maior, por mais tempo e próxima ao $VO_{2\text{máx}}$. Nas cargas submáximas avaliadas, observamos que o grupo TF-NO apresentou menor valor de VO_2 submáximo comparado com o grupo SED-CAF apenas no minuto 20. Já a produção de gás carbônico no decorrer do teste de esforço pode ser observada na figura 4. O grupo TF-NO apresentou menores valores de VCO_2 comparado ao SED-CAF nos minutos 10 e 20, sugerindo que para esses momentos, houve uma menor contribuição do metabolismo anaeróbico para a realização do exercício. Essa resposta pode garantir uma reserva energética para o final do exercício, prolongando o tempo de teste.

FIGURA 3. Volume de oxigênio consumido durante teste de esforço máximo. * $p \leq 0,05$ TF-NO vs. SED-CAF.

FIGURA 4. Volume de gás carbônico produzido durante teste de esforço máximo. * $p \leq 0,05$ TF-NO vs. SED-CAF.

A figura 5 ilustra os valores de volume de oxigênio e de gás carbônico ao longo do teste obtido por cada grupo de animais estudados. Quando ocorre a interseção das curvas de VO_2 e VCO_2 , pode-se sugerir que o QR atingiu valores iguais ou suficientemente próximos a 1, o que caracteriza que o máximo do esforço foi atingido no teste (PETROSINO et al., 2016). Interessante que nos dados obtidos durante o teste, observamos que não houve interseção das curvas em nenhum dos grupos, sugerindo que os animais não atingiram o máximo sob o ponto de vista metabólico, apesar de serem incapazes de continuar a execução do exercício físico. Assim, a figura 6 expõe a cinética do QR durante o teste de esforço, demonstrando que apesar do QR ter aumentado ao longo do teste, não foi o suficiente para alcançar valores próximos a 1, sem haver diferenças significativas entre os grupos para todos os momentos analisados.

FIGURA 5. Cinética do consumo de oxigênio (VO_2) e produção de gás carbônico (VCO_2) durante teste de esforço físico máximo. A) SED-NO; B) TF-NO; C) SED-CAF; D) TF-CAF.

FIGURA 6. Cinética do quociente respiratório durante teste de esforço máximo.

A figura 7 apresenta a cinética do quociente respiratório durante o teste de esforço, juntamente com a delimitação do limiar anaeróbio (AT). Pode-se observar

que o AT foi alcançado em um momento mais precoce para os grupos sedentários em relação aos treinados, contribuindo para a menor tolerância ao exercício.

FIGURA 7. Cinética do quociente respiratório (QR) durante teste de esforço e indicação do limiar anaeróbico (AT). A) SED-NO; B) TF-NO; C) SED-CAF; D) TF-CAF.

O custo relativo da corrida ($\%VO_{2m\acute{a}x}$) para cada grupo pode ser observado na figura 8. Nos minutos 10 e 20, os grupos treinados estavam realizando o exercício físico com menor percentual do $VO_{2m\acute{a}x}$ comparados ao grupo SED-CAF. O grupo TF-NO apresentou menor $\%VO_{2m\acute{a}x}$ nos minutos 20 e 30 comparado ao grupo SED-NO. Essa economia de VO_2 ao longo do tempo esteve associada com maior tempo para atingir o $VO_{2m\acute{a}x}$, tanto que o grupo TF-NO, que manteve menores valores de $\%VO_{2m\acute{a}x}$ até o minuto 30 comparado aos grupos sedentários foi quem apresentou maior tempo em teste. Além disso, o grupo TF-NO apresentou um platô no final do teste, permanecendo por mais tempo em valores próximos a 100% do $VO_{2m\acute{a}x}$. Essa característica demonstra elevada aptidão física. O mesmo não foi observado no grupo TF-CAF, apesar de ter permanecido por mais tempo no teste comparado ao grupo SED-CAF.

FIGURA 8. Cinética do custo relativo da corrida durante teste incremental máximo até a exaustão. * $p \leq 0,05$ TF-NO vs. SED-CAF; \$ $p \leq 0,05$ TF-NO vs. SED-NO; # $p \leq 0,05$ TF-CAF vs. SED-CAF.

A oxidação dos substratos (CHO e LIP) durante o teste incremental está demonstrada nas figuras 9, 10 e 11. A curva formada permite verificar que houve uma maior utilização de CHO conforme o teste progride no tempo e intensidade, enquanto a utilização de LIP tendeu a permanecer próxima a uma taxa constante, embora tenha uma curva menos definida. Todavia, não houve diferenças significativas em nenhum momento analisado durante o teste de esforço entre os grupos.

FIGURA 9. Cinética da taxa de oxidação de carboidratos durante teste de esforço até a exaustão.

FIGURA 10. Cinética da taxa de oxidação de lipídios durante teste de esforço até a exaustão.

FIGURA 11. Cinética da oxidação de carboidratos (CHO) e lipídios (LIP) durante teste de esforço até a exaustão: A) SED-NO; B) TF-NO; C) SED-CAF; D) TF-CAF.

5.3 Respostas no músculo sóleo

5.3.1 Atividade de enzimas oxidativas

Conforme mostra a figura 12, os grupos TF-NO e TF-CAF apresentaram aumento significativo da atividade enzimática da citrato sintase e da β -HAD no músculo sóleo comparados aos grupos SED-NO e SED-CAF.

FIGURA 12. Atividade das enzimas citrato sintase (A) e β -HAD (B) no músculo sóleo (n=7/grupo). *p<0,05 vs. SED-NO e SED-CAF.

5.3.2 Dinâmica Mitochondrial

As figuras 13, 14 e 15 apresentam a expressão das proteínas Mfn1, Mfn2 e Drp1, respectivamente. Embora a expressão de Mfn1 tenha aumentado 32% no grupo TF-NO quando comparado com o grupo SED-NO, não houve diferença estatística (figura 13).

FIGURA 13. Expressão proteica de Mfn1 no músculo sóleo (n=4-6/grupo).

Já a expressão de Mfn2 aumentou 39% no grupo SED-CAF e 59% no grupo TF-CAF quando comparados com SED-NO, no entanto, também não houve diferença estatística (figura 14). Embora exista um aumento de 35% na expressão de Drp1 no grupo TF-CAF, também não houve diferença estatística entre os grupos estudados (figura 15).

FIGURA 14. Expressão proteica de Mfn2 no músculo sóleo (n=6-7/grupo).

FIGURA 15. Expressão proteica de Drp1 no músculo sóleo (n=4-6/grupo).

5.3.3 Morfometria Mitochondrial

O conteúdo de mitocôndrias foi avaliado em amostras do músculo sóleo, e conforme pode ser observado na tabela 5, não houve diferença entre os grupos tanto no percentual de mitocôndrias localizadas na região SS quanto na região IMF. É importante ressaltar que a determinação do conteúdo de mitocôndrias foi proporcional aos espaços SS e IMF avaliados na imagem, os quais não foram diferentes entre os grupos. As micrografias utilizadas para quantificar as mitocôndrias estão representadas na figura 16.

TABELA 5 Conteúdo de mitocôndrias no músculo sóleo.

	SED-NO	TF-NO	SED-CAF	TF-CAF
SS mit (%)	13,25 ± 1,65	11,53 ± 1,67	13,22 ± 1,81	13,24 ± 1,19
SS espaço (%)	86,75 ± 1,65	88,47 ± 1,67	86,78 ± 1,81	86,76 ± 1,19
IMF mit (%)	16,94 ± 1,79	15,62 ± 1,95	15,74 ± 2,28	14,24 ± 1,84
IMF espaço (%)	83,06 ± 1,97	84,38 ± 2,14	84,26 ± 2,49	85,76 ± 2,02

Valores representados como média e erro padrão da média. SS= subsarcolemal; IMF= intermiofibrilar; mit= mitocôndrias (n=6).

FIGURA 16. Micrografias com aumento de 6200x utilizadas para análise de conteúdo mitocondrial no músculo sóleo. SS= subsarcolemal; IMF intermiofibrilar.

A dimensão mitocondrial está apresentada na figura 17. A dimensão das mitocôndrias não foi diferente entre os grupos estudados tanto no espaço SS quanto no espaço IMF.

Também não houve diferença no formato das mitocôndrias nos espaços SS e IMF entre os grupos, conforme demonstrado na figura 18. A figura 19 apresenta micrografias utilizadas para avaliar a dimensão e o formato mitocondrial.

FIGURA 17. Dimensão mitocondrial no espaço subsarcolemal (A) e no espaço intermiofibrilar (B) do músculo sóleo (n=6/grupo).

FIGURA 18. Formato mitocondrial no espaço subsarcolemal (A) e no espaço intermiofibrilar (B) do músculo sóleo (n=6/grupo).

FIGURA 19. Micrografias com aumento de 8900x utilizadas para análise de dimensão e formato mitocondrial no músculo sóleo. SS= subsarcolemal; IMF intermiofibrilar.

A tabela 6 apresenta os dados de integridade mitocondrial obtidos por meio da frequência de mitocôndrias com notas de 0 a 4. Na região SS, o grupo TF-CAF apresentou maior frequência de mitocôndrias com nota 3 ou 4 quando comparado ao grupo TF-NO, mostrando que a interação entre o TFA e a dieta de cafeteria pode causar danos mais severos na crista mitocondrial do que somente o TFA. Na região IMF, o grupo SED-CAF apresentou menor frequência de notas 1 ou 2 quando comparado ao grupo SED-NO, mostrando que o grupo da dieta teve menor dano moderado. A figura 20 mostra as imagens utilizadas para avaliar a integridade de crista mitocondrial.

TABELA 6. Integridade mitocondrial.

	SED-NO	TF-NO	SED-CAF	TF-CAF
Nota	SS			
0	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0
1 ou 2	3,3 ± 0,8	2,6 ± 0,5	2,1 ± 0,4	3,5 ± 0,6
3 ou 4	5,3 ± 0,7	4,1 ± 0,5	5,4 ± 0,7	7,3 ± 1,2 [#]
Nota	IMF			
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2
1 ou 2	3,4 ± 0,7	2,2 ± 0,4	1,4 ± 0,5 [*]	1,8 ± 0,5
3 ou 4	4,2 ± 1,0	4,2 ± 0,9	3,5 ± 0,5	3,3 ± 0,8

Valores representados como média e erro padrão da média. SS= subsarcolemal; IMF= intermiofibrilar; (n=6). [#]p≤0,05 vs. TF-NO e ^{*}p≤0,05 vs. SED-NO.

FIGURA 20. Micrografias com aumento de 39.000X utilizadas para análise de integridade de crista mitocondrial. SS= subsarcolemal; IMF intermiofibrilar.

5.3.4 Alça ECA2/Ang 1-7/Mas

As figuras 21, 22 e 23 representam a atividade enzimática de ECA2, a quantificação de Ang 1-7 e a expressão proteica do receptor Mas, respectivamente. Não houve diferença estatística na atividade da ECA2 e na expressão do receptor Mas. Além disso, embora não tenha havido diferença estatística, o grupo TF-NO apresentou 51,4% de aumento na concentração de Ang 1-7 quando comparado ao grupo SED-NO, enquanto o grupo TF-CAF apresentou um aumento de 30,55% quando comparado ao grupo SED-CAF (figura 22).

FIGURA 21. Atividade enzimática da ECA2 no músculo sóleo (n= 5/grupo).

FIGURA 22. Concentração de Ang 1-7 no músculo sóleo (n= 5/grupo).

FIGURA 23. Expressão proteica de receptor Mas no músculo sóleo (n= 5/grupo).

5.4 Respostas no músculo gastrocnêmio

5.4.1 Expressão gênica

Conforme demonstrado na tabela 7, não houve diferença na expressão gênica de Tfam, NRF-1 e COX II no músculo gastrocnêmio dos grupos estudados.

TABELA 7. Expressão de mRNA no músculo gastrocnêmio.

Genes	SED-NO (n=5)	TF-NO (n=5)	SED-CAF (n=5)	TF-CAF (n=5)
Tfam (UA)	1,0± 0,07	0,88± 0,12	1,20±0,16	1,25±0,10
NRF-1 (UA)	1,0± 0,11	0,73± 0,13	1,22±0,22	1,15± 0,04
COXII (UA)	1,0± 0,05	1,10± 0,16	1,02±0,21	1,25± 0,07

Cada valor representa o valor médio da expressão gênica. UA= unidades arbitrárias.

5.4.2 Atividade de enzimas oxidativas

Conforme mostra a figura 24, não foram observadas diferenças na atividade enzimática da citrato sintase e da β -HAD no músculo gastrocnêmio.

FIGURA 24. Atividade das enzimas citrato sintase (A) e β -HAD (B) no músculo gastrocnêmio (n=7/grupo).

5.4.3 Dinâmica Mitochondrial

As figuras 25, 26 e 27 representam a expressão das proteínas Mfn1, Mfn2 e Drp1, respectivamente. Não houve diferença estatística na expressão dessas proteínas no músculo gastrocnêmio dos grupos estudados.

FIGURA 25. Expressão proteica da Mfn1 no músculo gastrocnêmio (n= 5/grupo).

FIGURA 26. Expressão proteica da Mfn2 no músculo gastrocnêmio (n= 5/grupo).

FIGURA 27. Expressão proteica da Drp1 no músculo gastrocnêmio (n= 5/grupo).

5.4.4 Alça ECA2/Ang 1-7/Mas

Não houve diferença estatística na atividade da ECA2 (figura 28) e na expressão do receptor Mas (figura 30) no músculo gastrocnêmio. Além disso, embora não tenha havido diferença estatística para os níveis de Ang 1-7, o grupo TF-NO teve um aumento de 47,4% quando comparado ao grupo SED-NO, enquanto o TF-CAF teve uma redução de 44,8% quando comparado ao grupo SED-CAF (figura 29).

FIGURA 28. Atividade enzimática da ECA2 no músculo gastrocnêmio (n= 5/grupo).

FIGURA 29. Concentração de Ang1-7 no músculo gastrocnêmio (n= 5/grupo).

FIGURA 30. Expressão proteica de receptor Mas no músculo gastrocnêmio (n= 4/grupo).

6 DISCUSSÃO

O consumo de dieta de cafeteria e o sedentarismo estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de componentes da síndrome metabólica de forma até mais severa do que com o consumo de dietas ricas em gordura, principalmente para o excesso de peso, a hiperglicemia e a resistência à insulina (WATSON et al., 2000; SAMPEY et al., 2011). A dieta de cafeteria que utilizamos no presente trabalho já foi estudada previamente pelo nosso grupo, no qual foram observados aumento da massa e adiposidade corporal, intolerância à glicose avaliada no teste de tolerância à glicose e, resistência à insulina avaliada em teste de tolerância à insulina (HIGA et al., 2014a; HIGA et al., 2014b; AMERICO et al., 2019). Demonstramos ainda que, o TFA foi eficaz para a prevenção de tais prejuízos (HIGA et al., 2014a; AMERICO et al., 2019). Considerando que, no presente estudo, o grupo TF-CAF apresentou massa corporal significativamente menor comparado ao grupo SED-CAF no final do protocolo, mais uma vez confirmamos que o TFA previne o aumento da massa corporal. Além disso, embora os dados não tenham sido apresentados aqui, é importante ressaltar que parte dos animais foi submetida ao teste de tolerância à insulina apenas para confirmar a reprodutibilidade do modelo experimental de resistência à insulina (SED-CAF) e a prevenção por meio do TFA no TF-CAF.

Quando comparamos o peso do músculo gastrocnêmio entre os grupos, observamos que o grupo TF-NO apresentou maior peso que o grupo SED-CAF, ainda que esse grupo tenha massa corporal maior. Em outros estudos, o aumento do tecido adiposo pela dieta parece interferir na manutenção do músculo esquelético, graças ao aumento na degradação protéica associado a menor sensibilidade à insulina e menores níveis de adiponectina (ROSENO et al., 2015). De forma inversa, o TFA intenso pode aumentar o peso do músculo esquelético em animais treinados (FONTANA et al., 2013), ainda que esse resultado não seja tradicionalmente encontrado pelos estudos. Assim, os efeitos independentes da dieta de cafeteria no SED-CAF e do TFA no TF-NO podem explicar a diferença no peso do músculo gastrocnêmio quando comparados entre si (WANG et al., 2006; ZHOU et al., 2007; FONTANA et al., 2013; LEE et al., 2015).

O TFA não modificou o consumo de oxigênio em repouso dos animais treinados. Essa ausência de diferença também pode ser observada nos estudos de Kim et al. (2013) e Manio et al. (2018), que realizaram treinamento físico em esteira. Tendo em vista que em outro trabalho do nosso grupo, a natação foi capaz de aumentar o consumo de oxigênio em repouso (MAZZUCATTO et al., 2014), é possível que o tipo de treinamento físico possa ter uma influência diferente sobre essa variável.

No teste de esforço físico máximo, ambos os grupos treinados apresentaram aprimoramento no tempo até exaustão e na velocidade máxima atingida, o que indica melhora da capacidade aeróbia. No entanto, apenas o grupo TF-NO exibiu valores significativamente maiores das variáveis $VO_{2\text{máx}}$ e VO_2 pico comparado aos grupos sedentários. Os resultados do grupo TF-NO condizem com a literatura. Por exemplo, Kemi et al. (2002) mostraram aumento no $VO_{2\text{máx}}$ e na capacidade de exercício, além do remodelamento no tecido cardíaco e muscular em camundongos treinados. Enquanto Hoydal et al. (2007) estabeleceram uma relação entre $VO_{2\text{máx}}$ e velocidade de corrida tanto para ratos quanto para camundongos. Adicionalmente, como observado pelos próprios autores, o TFA foi capaz de alterar a relação entre VO_2 e velocidade de corrida, com os animais treinados consumindo menos oxigênio em cargas submáximas do exercício, o que caracterizou melhor economia de corrida. De fato, no presente estudo, observamos que ambos os grupos treinados apresentaram melhora na economia de corrida.

O grupo TF-CAF apresentou aumento de aproximadamente 8% no $VO_{2\text{máx}}$, porém sem diferença estatística em relação ao grupo SED-CAF. Embora o TF-CAF apresente melhora no tempo até a exaustão, é possível que esse efeito não seja acompanhado de aumento significativo no $VO_{2\text{máx}}$. Uma possível explicação para isso é o próprio tipo de teste utilizado (progressivo e escalonado), que como demonstrado por PETROSINO et al. (2016), é mais adequado para avaliar a *endurance* aeróbia e a tolerância ao exercício do que propriamente variações no $VO_{2\text{máx}}$. Além disso, afirmam que é característico desse modelo de teste a ausência de interceptação da curva do VO_2/VCO_2 , de QR superior a 1 e alterações significativas na oxidação dos substratos. Diante disso, a utilização do iVO_2 pode ser mais adequado para avaliar a capacidade aeróbia do que o $VO_{2\text{máx}}$ (MACHADO; CAPUTO; DENADAI, 2004). Esse dado corrobora Caputo et al. (2001) que demonstraram que a utilização do iVO_2 também foi capaz de superar o $VO_{2\text{máx}}$ como

variável preditora da capacidade aeróbia. É provável que esses achados se devam ao fato de o $\text{VO}_2\text{máx}$ restringir os efeitos do treino em um parâmetro isolado, na representação da potência aeróbia máxima, enquanto o iVO_2 agrega a relação entre potência aeróbia e economia de movimento (MACHADO; CAPUTO; DENADAI, 2004).

O AT mais tardio em ambos os grupos treinados foi identificado no nosso estudo. A fração do $\text{VO}_2\text{máx}$ utilizado ($\%\text{VO}_2\text{máx}$) até que o AT seja alcançado está diretamente associada com a capacidade aeróbia (GHOSH, 2004). Além disso, serve como bom marcador para o prognóstico e tolerância ao exercício em pacientes cardíacos (WASSERMAN; MCILROY, 1964), pois simboliza a intensidade limite para a realização do exercício físico sem desenvolvimento de acidose metabólica. Quanto mais tardio o AT no exercício físico, maior a intensidade de exercício que pode ser sustentada por um tempo prolongado, conseqüentemente, maior o gasto energético promovido pelo exercício físico. Esse resultado está associado aos benefícios à saúde fornecidos pelo exercício físico (PAES et al., 2016), podendo inclusive ter sido responsável pela diferença no peso corporal final encontrada nos grupos treinados comparado aos sedentários. Desta forma, além dos dados que indicam melhoras na performance do exercício como velocidade máxima e tempo até exaustão, podemos identificar aprimoramentos na capacidade aeróbia através dos valores do $\text{VO}_2\text{máx}$, do iVO_2 , aumento no VO_2 de reserva e menor custo relativo de corrida dos animais treinados.

Alterações enzimáticas favorecem a maior eficiência mitocondrial, ou seja, uma razão mais favorável entre moléculas de ATP produzidas e de oxigênio consumida (SALIN et al., 2015), uma maior taxa de oxidação de gorduras e/ou redução no acúmulo de lactato (BASSETT; HOWLEY, 2000). Quando analisamos a atividade da enzima citrato sintase como marcador de TFA, ambos os grupos treinados apresentaram maior atividade comparado aos grupos sedentários no músculo sóleo. Esse resultado corrobora outros estudos (TAYLOR et al., 2005; TAMURA et al., 2014; WOJEWODA et al., 2014). A atividade da enzima β -HAD em sóleo seguiu o mesmo padrão da atividade da enzima citrato sintase, sendo maior nos grupos treinados em relação aos sedentários, semelhante a outro trabalho (DELAVAR et al., 2014). Os efeitos do TFA sobre a atividade enzimática da β -HAD são contraditórios na literatura, pois alguns estudos também mostraram que o TFA não induziu aumento na atividade de β -HAD em sóleo (TAMURA et al., 2014; SUZUKI, 2017). De qualquer forma, o

aumento na atividade das enzimas citrato sintase e β -HAD sinaliza a melhora na capacidade oxidativa do músculo sóleo, o que corrobora os dados de teste de esforço físico máximo.

Não houve diferença na atividade da citrato sintase no músculo gastrocnêmio, o que também foi demonstrado por Wojewoda et al. (2015). Entretanto, alguns estudos reportam aumento na atividade da citrato sintase nesse tecido por meio do TFA (DELAVAR et al., 2014; SUZUKI, 2016). Além disso, embora existam estudos que demonstrem aumento na atividade da β -HAD no músculo gastrocnêmio de animais treinados (SUZUKI, 2017), não encontramos diferenças entre os grupos. O mesmo foi demonstrado por Suzuki et al. (2016). Esses achados revelam que as adaptações metabólicas ao TFA não se manifestam igualmente em todos os músculos esqueléticos. De fato, por terem quantidades de tipos de fibras diferentes, os músculos com maior percentual de fibras vermelhas, como o sóleo, podem apresentar adaptações metabólicas oxidativas mais significativas ao TFA. Por outro lado, músculos com menor percentual de fibras vermelhas podem responder menos aos estímulos do TFA (GAVIN; WESTERKAMP; ZWETSLOOT, 2006; JIN; WERNIG; WITZEMANN, 2008; MEHAN et al., 2011; HOLT et al., 2012; SITPARAN et al., 2014).

Em nosso estudo, não houve diferença na expressão gênica de NRF-1, Tfam e COXII no músculo gastrocnêmio. Tais achados junto com os dados de enzimas oxidativas reforçam que o TFA não promoveu adaptações no músculo gastrocnêmio. Diferentes estudos na literatura avaliaram os efeitos do TFA na expressão dos genes investigados nesse trabalho. Em um deles, adolescentes obesos treinados por 12 semanas em cicloergômetro também não apresentaram diferença na expressão gênica de NRF-1 no músculo vasto lateral (VARGAS-ORTIZ et al., 2018). Em outro estudo, homens que realizaram 12 sessões de treino intenso e intervalado em cicloergômetro, foi observada diminuição na expressão gênica de NRF-1 e inalteração na expressão de Tfam (AGUIAR et al., 2016). Em indivíduos diabéticos submetidos ao TFA e de força, não houve diferença na expressão gênica de COXII (FATONE et al., 2010). Em animais, os resultados parecem ser semelhantes. Em ratos idosos, o TFA foi capaz de aumentar os níveis de Tfam apenas quando comparados aos ratos sedentários idosos, mas não em relação a camundongos jovens sedentários (KANG et al., 2013). Em ratos treinados na natação, não foi observada mudança na expressão gênica de NRF-1 e Tfam no músculo sóleo (CHUNG; PARK; LIM, 2017). De forma

semelhante, em ratos treinados em esteira, também não houve diferença na expressão gênica de NRF-1 no músculo sóleo (MURAKAMI et al., 1998).

A dinâmica mitocondrial pode ser definida como a capacidade existente nas mitocôndrias que permite alterações na sua distribuição, dimensão e formato. Assim, proteínas envolvidas na fusão, como Mfn1 e Mfn2, e proteínas atuantes na fissão, como Drp1, permitem que a mitocôndria se adapte a uma determinada condição ou estímulo (TILOKANI et al., 2018). O processo de fusão está envolvido com a manutenção da saúde mitocondrial (ROY et al., 2015), de forma que a maior expressão de Mfn1 e Mfn2 está associada com melhor captação de glicose (KONG et al., 2013), e o *knockout* dessas proteínas apresenta limitações na β -oxidação e prejuízo na oxidação de ácidos graxos (RAMBOLD; COHEN; SCHWARTZ, 2015).

Dietas ricas em gorduras levam a maior deposição de lipídios intramusculares (SCHRAUWEN-HINDERLING et al., 2005), e mesmo que a oxidação aumente como um mecanismo compensatório, esse aumento não é proporcional ou na mesma velocidade que a maior captação de ácidos graxos (BONEN et al., 2015; BAEK et al., 2018). Nessa condição, observa-se aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AON; BHATT; CORTASSA, 2014), elevação da expressão de Drp1 e diminuição na expressão de mitofusinas (WATANABE et al., 2014). Por mais que essa alteração na expressão de proteínas da dinâmica mitocondrial possa ser observada nos músculos sóleo (LI et al., 2018) e gastrocnêmio de animais alimentados com dieta rica em gordura (PATTANAKUHAR et al., 2019), nós não encontramos esse resultado em nosso modelo em nenhum dos músculos.

O TFA tem o potencial de aumentar a expressão de mitofusinas e reduzir a expressão de Drp1, inclusive na presença de dietas ricas em gordura, normalizando os valores próximos ao controle (LI et al., 2018; PATTANAKUHAR et al., 2019), melhorando a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (FEALY et al., 2014). Um resultado semelhante era esperado em nosso estudo, e embora o grupo TF-NO tenha aumentado a expressão de Mfn1 em 32% e reduzido a expressão de Drp1 em 27% no músculo sóleo, não houve diferença estatística.

Esperávamos também que um possível aumento na expressão de Drp1 com a dieta de cafeteria fosse previnido pelo TFA. Entretanto, o grupo TF-CAF teve uma queda de 65,5% na expressão de Mfn1 e um aumento de 84,9% na expressão de Drp1 comparado ao grupo TF-NO, também sem diferença estatística. Tanto o TFA

(POWERS; RADAK; JI, 2016) quanto a dieta (CRESCENZO et al., 2013; PINHO et al., 2017) podem induzir a maior produção de ROS pela mitocôndria e já existem estudos demonstrando sua relação com o processo de fissão mitocondrial (IQBAL; HOOD, 2014). Assim, a união de TFA e dieta pode ter causado uma alteração no estado de dinâmica mitocondrial graças a uma produção de ROS possivelmente maior, sendo que esse efeito não foi visto nas duas variáveis isoladas. Esses resultados mostram que o TFA pode regular proteína de fusão mitocondrial e que o consumo de dieta de cafeteria associado ao TFA pode alterar esse efeito e, portanto, inibir parte das adaptações benéficas do TFA na dinâmica mitocondrial.

O protocolo de TFA utilizado não promoveu alteração no conteúdo, na dimensão e no formato mitocondrial, independente da região do músculo esquelético avaliada. Em seres humanos, o efeito do TFA nas mitocôndrias está amplamente descrito na literatura. Homens e mulheres submetidos ao TFA em cicloergômetro apresentam aumento no conteúdo mitocondrial em ambas as regiões SS e IMF (DEVRIES et al., 2013; LUNDBY et al., 2018). Em homens e mulheres treinados durante 7 semanas a 60% do VO_2 pico, tanto o conteúdo mitocondrial como a dimensão mitocondrial foram aumentados (TARNOPOLSKY et al., 2007). Durante 14 semanas, homens e mulheres realizaram exercícios com 60% de 1RM, sem causar diferenças nas mitocôndrias da região SS. Entretanto, na região IMF houve aumento no volume mitocondrial, sem ocorrer alteração no tamanho das mitocôndrias. De forma interessante, essa diferença se dá através do aumento no número e redução no tamanho mitocondrial nas mulheres, enquanto nos homens não houve alteração no número, mas aumento no tamanho mitocondrial (MILLER et al., 2017). Em outro estudo com treinamento resistido, indivíduos treinados por 16 semanas a 60% de 1RM apresentaram aumento na dimensão mitocondrial sem alteração no formato mitocondrial (SANTORO et al., 2002).

Nos estudos com animais, a resposta do conteúdo mitocondrial ao TFA parece não ser tão clara. Ratas fêmeas treinadas por 4 semanas a 75% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$ apresentaram menor conteúdo mitocondrial no músculo plantar quando comparado aos animais sedentários. Para o músculo sóleo, o TFA não provocou diferenças no conteúdo mitocondrial, assemelhando-se ao nosso resultado (POOLE; MATHIEU-COSTELLO, 1996). Em ratos treinados na esteira por 10 semanas, o conteúdo mitocondrial nos músculos sóleo e vasto lateral foram maiores comparados ao animais

sedentários (KIRKWOOD; PACKER; BROOKS, 1987). Em porcos da Índia treinados 5 vezes na semana, por 6 semanas a 70% $\text{VO}_2\text{máx}$, houve aumento do conteúdo mitocondrial no vasto intermédio, mas não do músculo sartório (HOPPELER; ALTPETER; WAGNER, 1995). Assim, intensidade, duração, período de treinamento parecem interferir nas adaptações em animais. Inclusive, indivíduos treinados pelo mesmo tempo e com intensidade média, mas com protocolos diferentes, apresentaram magnitudes de aumentos distintas no conteúdo mitocondrial (MONTERO; LUNDBY, 2017).

As respostas mitocondriais também sofrem influência da dieta. Em camundongos diabéticos alimentados com dieta rica em gordura, a dimensão das mitocôndrias tanto da região IMF quanto da região SS no músculo gastrocnêmio é diminuída (YOKOTA et al., 2009; SUGA et al., 2014). Em ratos treinados na natação por 8 semanas e alimentados com dieta rica em açúcar (adição de leite condensado e sacarose), o conteúdo mitocondrial aumentou nos animais sedentários que consumiram a dieta rica em açúcar e nos animais que treinaram, mas não nos animais que consumiram a dieta e treinaram. Assim, parece que a interação treino e dieta pode impedir o aumento no conteúdo mitocondrial como um mecanismo compensatório (DE QUEIROZ et al., 2017).

Além disso, a dieta pode alterar a integridade das mitocôndrias, pois de acordo com um estudo prévio, animais alimentados com dieta rica em açúcar apresentaram maior percentual de mitocôndrias danificadas (DE QUEIROZ et al., 2017). Em outro estudo, camundongos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar por 16 semanas apresentaram queda no conteúdo de mitocôndrias, maior dano e inchaço nas cristas mitocondriais tanto da região SS como da região IMF (BONNARD et al., 2008). Em nosso estudo, tanto a dieta quanto o TFA não foram capazes de alterar a integridade de crista mitocondrial na região SS. Entretanto, identificamos que animais do grupo TF-CAF apresentaram degradação mais severa quando comparados aos animais do grupo TF-NO, mostrando juntamente com a dinâmica mitocondrial que a adição da dieta de cafeteria ao TFA pode induzir ao estado de fissão e maior degradação mitocondrial possivelmente associado ao maior estresse oxidativo.

Na região IMF, que tem maior potencial oxidativo (FERREIRA et al., 2010) e maior capacidade de adaptação aos estímulos do que a região SS (CRESCENZO et al., 2014), o grupo SED-CAF apresentou menor degradação mitocondrial quando

comparado ao grupo SED-NO. Esse resultado é surpreendente uma vez que esperávamos maior degradação mitocondrial com uma dieta que induz intolerância à glicose e resistência à insulina. Uma possível explicação pode ser a maior produção de ROS que induz o aumento na expressão da proteína desacopladora-3 (UCP3) por efeito compensatório, prevenindo o estresse oxidativo, como visto em outros estudos com dieta rica em frutose (STEPHENSON et al., 2012) e dieta rica em gordura (SCHRAUWEN et al., 2001). Aliado a esse efeito compensatório, o reverastrol contido no amendoim da nossa dieta teria o potencial de diminuir a produção de ROS e consequentemente inibir danos moderados na região IMF. Entretanto, esse efeito não seria capaz de conter danos severos, inclusive o possível estresse causado pela união de TFA e dieta, como visto na região SS do grupo TF-CAF (SALES; RESURRECCION, 2014; HAOHAO et al., 2015).

Embora a literatura tenha demonstrado que o TFA modula a alça do SRA estudado no presente estudo, nossos resultados tanto no músculo sóleo quanto no gastrocnêmio foram diferentes do esperado. Isso porque os aumentos na atividade da ECA2 e na concentração de Ang 1-7 apresentados pelo grupo TF-NO não foram estatisticamente significantes. Não podemos descartar a possibilidade do tamanho da amostra ter interferido nesse resultado, uma vez que os ensaios realizados apresentaram elevada variabilidade. Quanto aos resultados do grupo TF-CAF, é possível que não apenas o número da amostra tenha efeito, mas também que a dieta de cafeteria tenha influenciado a resposta do SRA. Nesse sentido, em um estudo prévio do nosso grupo, demonstramos que o TFA induziu aumento na concentração de Ang 1-7 no tecido adiposo subcutâneo e no soro do grupo TF-NO, no entanto, esse efeito foi abolido no grupo TF-CAF (AMÉRICO et al., 2019). Por outro lado, observamos que o grupo TF-CAF apresentou aumento na expressão dos receptores Mas, AT1 e AT2 no tecido adiposo subcutâneo, revelando que a resposta do SRA não segue padrão único nos diferentes tecidos metabolicamente ativos. Por fim, observamos que no soro, ambos os grupos treinados TF-NO e TF-CAF exibiram aumento na atividade da enzima ECA2 (AMÉRICO et al., 2019).

Outros estudos demonstraram os efeitos de dietas e do TFA sobre as proteínas do SRA. Nos rins, a dieta rica em gordura tem o potencial de aumentar os receptores AT1 e AT2 (PANDEY et al., 2015), enquanto no pâncreas tem o potencial de aumentar a expressão de receptores AT1 e diminuir a expressão de receptores AT2 e Mas

(FRANTZ et al., 2013). No fígado, a dieta rica em frutose não alterou a atividade da ECA2, porém diminui a expressão do receptor Mas (FRANTZ et al., 2017a). Adicionalmente, o TFA impediu o aumento na quantidade de AngII e da atividade da ECA, e aumentou a concentração de Ang1-7 e expressão do receptor Mas no fígado de animais alimentados com dieta rica em frutose (FRANTZ et al., 2017a). O músculo esquelético também parece sofrer alterações com a dieta rica em gordura, sendo que há queda na expressão de receptor Mas e aumento do receptor AT1 (FRANTZ et al., 2017b). No entanto, o efeito do TFA parece depender do volume de treino, pois somente animais submetidos a dieta rica em gordura e treinados com alto volume apresentaram aumento na expressão do receptor Mas e queda no receptor AT1 no músculo esquelético (FRANTZ et al., 2017b). Os efeitos da infusão de Ang1-7 já foram descritos em animais alimentados com dieta rica em gordura, tais como aumento do VO_2 de repouso, da captação de glicose (WILLIAMS et al., 2016), da sensibilidade à insulina (MORIMOTO et al., 2017), diminuição dos níveis de triglicerídios e LDL, e aumento do HDL (FELTENBERGER et al., 2013). Camundongos deficientes em ECA2 demonstraram menor tolerância à realização de exercício voluntário em roda. Além do mais, a hipertrofia do músculo sóleo nos animais treinados não ocorre no grupo deficiente em ECA2 (MOTTA-SANTOS et al., 2016). Quando testados em esteira até exaustão, animais deficientes em ECA2 demonstraram redução na capacidade física (TAKESHITA et al., 2018), indicando que parte das adaptações ao TFA podem estar associada a alça Ang 1-7/ECA2/Mas. Embora esses achados revelem a associação da alça Ang 1-7/ECA2/Mas com a capacidade aeróbia, no presente estudo a melhora na resposta ao teste de esforço físico máximo apresentada pelos grupos treinados aconteceu independente da modulação dos componentes do SRA avaliados.

7 CONCLUSÃO

O conjunto de dados obtidos no presente estudo permite concluir que o TFA preveniu o aumento do peso corporal induzido pela dieta de cafeteria, melhorou a capacidade aeróbia e promoveu aumento na atividade de enzimas oxidativas no músculo sóleo. Entretanto, as adaptações induzidas pelo TFA não foram associadas com a modulação da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no músculo esquelético.

REFERÊNCIAS

ABUOHASHISH, H. M. et al. The ACE-2/Ang1-7/Mas cascade enhances bone structure and metabolism following angiotensin-II type 1 receptor blockade. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, n. April, p. 44–55, 2017.

AGUIAR, P. F. et al. Post-exercise cold water immersion does not alter high intensity interval training-induced exercise performance and Hsp72 responses, but enhances mitochondrial markers. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 5, p. 793–804, 2016.

AIELLO, A. M. et al. Prevalence of Obesity in Children and Adolescents in Brazil: A Meta-analysis of Cross-sectional Studies. **Current Pediatric Reviews**, v. 11, n.1,p.36–42,2015.

ALBERTS, B.; ALEXANDER, J.; DAVID, M. Biologia molecular da célula. 6. ed. 2017.

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E.; ZAMMIT, V. a. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **The Biochemical journal**, v. 154, n. 3, p. 689–700, 1976.

AMÉRICO, A. L. V. et al. Aerobic exercise training prevents obesity and insulin resistance independent of the renin angiotensin system modulation in the subcutaneous white adipose tissue. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–22, 2019.

AON, M. A.; BHATT, N.; CORTASSA, S. Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. **Frontiers in Physiology**, v. 5 JUL, n. July, p. 1–13, 2014.

ARAÚJO, C. G. S. De; HERDY, A. H.; STEIN, R. Maximum Oxygen Consumption Measurement: Valuable Biological Marker in Health and in Sickness. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 4, p. 51–53, 2013.

ARAUJO, M. et al. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v. 25, n. 39, 2000.

ATLAS, S. A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n.8, p. 9–20, 2007.

AXELROD, C. L. et al. Exercise training remodels human skeletal muscle mitochondrial fission and fusion machinery towards a pro-elongation phenotype. **Acta Physiologica**, v. 225, n. 4, p. 1–9, 2019.

BAAR, K. Involvement of PPAR γ co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR α in the adaptive response to endurance exercise. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 02, p. 269–273, 2004.

BACH, D. et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: A novel regulatory mechanism altered in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 17190–17197, 2003.

BAEK, K.-W. et al. Effects of regular-moderate exercise on high-fat diet-induced intramyocellular lipid accumulation in the soleus muscle of Sprague-Dawley rats. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 14, n. 1, p. 32–38, 2018.

BARNES, B. R. et al. Changes in exercise-induced gene expression in 5'-AMP-activated protein kinase γ 3-null and γ 3 R225Q transgenic mice. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3484–3489, 2005.

BASS, A. et al. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. **European J Biochem**, v. 10, n. 2, p. 198–206, 1969.

BASSETT, D. R.; HOWLEY, E. T. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 32, n. 1, p. 70–84, 2000.

BAYLE, J. Insulin resistance and muscle metabolism in chronic kidney disease. **ISRN Endocrinology**, v. 2013, 2013.

BERGERON, R. et al. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 281, p. 1340–1346, 2001.

BERGMAN, B. C. et al. Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 276, n. 1, p. E106–E117, 1999.

BERTAGNOLLI, M. et al. An orally active angiotensin-(1-7) inclusion compound and exercise training produce similar cardiovascular effects in spontaneously hypertensive rats. **Peptides**, v. 51, p. 65–73, 2014.

BISHOP, D. J.; GRANATA, C.; EYNON, N. Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 4, p. 1266–1275, 2014.

BOECKNER, L. S.; PULLEN, C. H.; WALKER, S. N. Differences in Eating and Activity Behaviors, Health History, and Biomarkers among Normal-Weight, Overweight, and Obese Rural Midwestern Hispanic Women. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 106, n. 11, p. 1870–1874, 2006.

BONEN, A.; PAROLIN, M.; STEINBERG, G. Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal. **FASEB Journal**, v. 18, n. 10, p. 1144–46, 2004.

BONEN, A. et al. Extremely rapid increase in fatty acid transport and intramyocellular lipid accumulation but markedly delayed insulin resistance after high fat feeding in rats. **Diabetologia**, v. 58, n. 10, p. 2381–2391, 2015.

BONNARD, C.; DURAND, A.; PEYROL, S. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 789–800, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. BRASIL: Ministério da Saúde, 2017.

BREARLEY, M. B.; ZHOU, S. Mitochondrial DNA and maximum oxygen consumption. **Sportscience**, v. 5, n. 2, p. 1–4, 2001.

BROOKS, G. A.; WHITE, P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **American Physiological Society**, 1978.

CAPUTO, F.; LUCAS, R. De; MANCINI, E. Comparação de diferentes índices obtidos em testes de campo para predição da performance aeróbia de curta duração no ciclismo. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 9, n. 4, p. 13–17, 2001.

CASABURI, R.; STORER, T.; BEN-DOV, I. Effect of endurance training on possible determinants of VO during heavy exercise. **Journal of applied physiology** v. 62, n. 1, p. 199–207, 1987.

CHHABRA, K. H. et al. Reprogramming the body weight set point by a reciprocal interaction of hypothalamic leptin sensitivity and Pomc gene expression reverts extreme obesity. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 10, p. 869–881, 2016.

CHOMENTOWSKI, P. et al. Skeletal muscle mitochondria in insulin resistance: Differences in intermyofibrillar versus subsarcolemmal subpopulations and relationship to metabolic flexibility. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 2, p. 494–503, 2011.

CHUNG, N.; PARK, J.; LIM, K. The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 39–47, 2017.

CIAMPIONE, S. et al. Long term exercise attenuates blood pressure responsiveness and modulates kidney angiotensin II signaling an during urinary sodium excretion in SHR. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syste**, v. 12, n. 4, p. 394–403, 2011.

CISTERNAS, F. et al. Angiotensin-(1-7) decreases skeletal muscle atrophy induced by angiotensin II through a Mas receptor-dependent mechanism. **Clinical Science**, v. 128, n. 5, p. 307–319, 2015.

CONNOR, T. et al. Metabolic remodelling in obesity and type 2 diabetes: Pathological or protective mechanisms in response to nutrient excess? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 42, n. 1, p. 109–115, 2015.

CRESCENZO, R. et al. Increased skeletal muscle mitochondrial efficiency in rats with fructose-induced alteration in glucose tolerance. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 11, p. 1996–2003, 2013.

CRESCENZO, R. et al. Alterations in proton leak, oxidative status and uncoupling protein 3 content in skeletal muscle subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria in old rats. **BMC Geriatrics**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

CURI, R. et al. Ciclo de Krebs como fator limitante na utilização de ácidos graxos durante o exercício aeróbico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, p. 135–143, 2003.

CURI, R.; PROCOPIO, J. Fisiologia Básica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

DAVIDSON, S. R.; BURNETT, M.; HOFFMAN-GOETZ, L. Training effects in mice after long-term voluntary exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 38, n. 2, p. 250–255, 2006.

DE PÁDUA, M. F. et al. Exercício Físico Reduz a Hiperglicemia de Jejum em Camundongos Diabéticos Através da Ativação da AMPK. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 3, p. 179–184, 2009.

DE QUEIROZ, K. B. et al. Physical activity prevents alterations in mitochondrial ultrastructure and glucometabolic parameters in a high-sugar diet model. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–20, 2017.

DELARUE, J.; MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance during pregnancy. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 2, p. 142–148, 2007.

DELAVAR, H. et al. Skeletal myofiber VEGF is essential for the exercise training response in adult mice. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 306, n. 8, p. R586-95, 2014.

DEVRIES, M. C. et al. Endurance training modulates intramyocellular lipid compartmentalization and morphology in skeletal muscle of lean and obese women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 12, p. 4852–4862, 2013.

DONOGHUE, M. A novel angiotensin-converting enzyme related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. **Circ Res**, v. 87, n. 5, p. 1–9, 2000.

DUNCAN, J. G. et al. Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor- α /PGC-1 α gene regulatory pathway. **Circulation**, v. 115, n. 7, p. 909–917, 2007.

EATON, S.; BARTLETT, K. B.; POURFARZAM, M. Mammalian mitochondrial β - oxidation. **Biochemical Journal**, v. 320, n. 2, p. 345–357, 1996.

ECHEVERRÍA-RODRÍGUEZ, O.; DEL VALLE-MONDRAGÓN, L.; HONG, E. Angiotensin 1-7 improves insulin sensitivity by increasing skeletal muscle glucose uptake in vivo. **Peptides**, v. 51, p. 26–30, 2014.

EVANGELISTA, F. S. et al. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 1141–1146, 2005.

EVANGELISTA, F. S. et al. Physical training improves body weight and energy balance but does not protect against hepatic steatosis in obese mice. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 7, p. 10911–10919, 2015.

FATONE, C. et al. Two weekly sessions of combined aerobic and resistance exercise are sufficient to provide beneficial effects in subjects with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 33, n. 7, p. 489–495, 2010.

FEALY, C. E. et al. Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 3, p. 239–245, 2014.

FELTENBERGER, J. D. et al. Oral formulation of angiotensin-(1-7) improves lipid metabolism and prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 324–330, 2013.

FERNANDES, T.; HASHIMOTO, N.; MAGALHÃES, F. Aerobic Exercise Training–Induced Left Ventricular Hypertrophy Involves Regulatory MicroRNAs, Decreased Angiotensin-Converting Enzyme-Angiotensin II, and Synergistic Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2-Angiotensin (1–7). **Hypertension**, v. 58, n. 2, p. 182–9, 2011.

FERNANDES, T.; HASHIMOTO, N.; OLIVEIRA, E. Characterization of angiotensin-converting enzymes 1 and 2 in the soleus and plantaris muscles of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 9, p. 837–842, 2010.

FERRANNINI, E. The Theoretical Bases of Indirect Calorimetry: **Metabolism**, v. 37, n. 3, p. 287–301, 1988.

FERRARIO, C.; TRASK, A.; JESSUP, J. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 6, p. 2281–2290, 2005.

FERREIRA, J.; ROLIM, N.; BARTHOLOMEU, J. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007.

FERREIRA, R. et al. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. **Proteomics**, v. 10, n. 17, p. 3142–3154, 2010.

FONTANA, K et al. Effects of anabolic steroids and high-intensity aerobic exercise on skeletal muscle of transgenic mice . **Plos one**, v. 8, n. 11, p.1-8, 2013.

FRANTZ, E. D. C. et al. Exercise training modulates the hepatic renin–angiotensin system in fructose-fed rats. **Experimental Physiology**, v. 102, n. 9, p. 1208–1220, 2017a.

FRANTZ, E. D. C. et al. High, but not low exercise volume, shifts the balance of renin angiotensin system towards ACE2/Mas receptor axis in skeletal muscle in obese rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 313, 473-482b, 2017.

FUJII, N. et al. Ablation of AMP-Activated Protein Kinase 2 Activity Feeding of Mice. **Animals**, v. 57, p. 2958–2966, 2008.

GAIDHU, M. P.; CEDDIA, R. B. The role of adenosine monophosphate kinase in remodeling white adipose tissue metabolism. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 39, n. 2, p. 102–108, 2011.

GARBER, C. E. et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 7, p. 1334–1359, 2011.

GAVIN, T. P.; WESTERKAMP, L. M.; ZWETSLOOT, K. A. Soleus, plantaris and gastrocnemius VEGF mRNA responses to hypoxia and exercise are preserved in aged compared with young female C57BL/6 mice. **Acta Physiologica**, v. 188, n. 2, p. 113–121, 2006.

GHOSH, A. K. Anaerobic Threshold: Its Concept and Role in endurance sport. **Malaysian J. Med. Sci.**, v. 11, n. 1, p. 24–36, 2004.

GANI, J. F. et al. Chronic infusion of angiotensin-(1–7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 2, p. E262–E271, 2009.

GOMES-SANTOS, I. L. et al. Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2014.

GUIMARÃES, G. G. et al. Exercise induces renin-angiotensin system unbalance and high collagen expression in the heart of Mas-deficient mice. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 54–61, 2012.

GURLEY, J.; GRIESEL, B.; OLSON, A. Increased Skeletal Muscle Glut4 Expression in Obese Mice after Voluntary Wheel Running Exercise is Post-Transcriptional. **Diabetes**, n. 204, p. 1–30, 2015.

HABOUZIT, E. et al. Decreased muscle ACE activity enhances functional response to endurance training in rats, without change in muscle oxidative capacity or contractile phenotype. **Journal of applied physiology**, v. 107, n. 1, p. 346–353, 2009.

HAOHAO, Z. et al. Resveratrol improves high-fat diet induced insulin resistance by rebalancing subsarcolemmal mitochondrial oxidation and antioxidantation. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 121–131, 2015.

HEGARTY, B. D. et al. Increased efficiency of fatty acid uptake contributes to lipid accumulation in skeletal muscle of high fat-fed insulin-resistant rats. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1477–1484, 2002.

HEO, M.; KIM, E. Effects of Endurance Training on Lipid Metabolism and Glycosylated Hemoglobin Levels in Streptozotocin-induced Type 2 Diabetic Rats on a High-fat Diet. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 25, n. 8, p. 989–992, 2013.

HERICHOVA, I. SZANTOOVA, K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. **Endocrine regulations**, v. 47, n. 1, p. 39–52, 2013.

HIGA, T. S. et al. Physical training prevents body weight gain but does not modify adipose tissue gene expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 10, p. 988–994, 2012.

HIGA, T. S. et al. Remodeling of white adipose tissue metabolism by physical training prevents insulin resistance. **Life Sci**, v. 103, n. 1, p. 41–48, 2014a.

HIGA, T. S. et al. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 47–54, 2014b.

HOLT, L. J. et al. Grb10 regulates the development of fiber number in skeletal muscle. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 9, p. 3658–3669, 2012.

HOPKINS, M.; BLUNDELL, J. E. Energy balance, body composition, sedentariness and appetite regulation: pathways to obesity. **Clinical Science**, v. 130, n. 18, p. 1615–1628, 2016.

HOPPELER, H.; ALTPETER, E.; WAGNER, M. Cold acclimation and endurance training in guinea pigs: Changes in lung, muscle and brown fat tissue. **Respiration Physiology**, v. 101, n. 2, p. 183–188, 1995.

HOYDAL, M. A. et al. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: Practical implications for exercise training. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 14, n. 6, 2007.

HUANG, X. et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 11, p. 1483–1496, 2018.

IIZUKA, K.; MACHIDA, T.; HIRAFUJI, M. Skeletal Muscle Is an Endocrine Organ. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 125, n. 2, p. 125–131, 2014.

IQBAL, S.; HOOD, D. A. Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 306, n. 12, p. C1176–C1183, 2014.

IQBAL, S.; HOOD, D. A. The role of mitochondrial fusion and fission in skeletal muscle function and dysfunction. **Frontiers in Bioscience**, v. 20, p. 157–172, 2015.

JHENG, H. F.; TSAI, P. J.; GUO, S. M. Mitochondrial Fission Contributes to Mitochondrial Dysfunction and Insulin Resistance in Skeletal Muscle. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 2, p. 309–319, 2011.

JIANG, F. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1–7: novel therapeutic targets. **Nature Reviews Cardiology**, v. 11, n. 7, p. 413–426, 2014.

JIN, T.-E.; WERNIG, A.; WITZEMANN, V. Changes in acetylcholine receptor function induce shifts in muscle fiber type composition. **FEBS journal**, v. 275, n. 9, p. 2042–54, 2008.

KANG, C. et al. Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: Role of PGC-1 α . **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 11, p. 1343–1350, 2013.

KELLEY, D. E. et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 2944–50, 2002.

KELLEY, D. E. Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 7, p. 1699–1702, 2005.

KEMI, O. et al. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. **J Appl Physiol** (1985). 2002;93(4):1301-9.

KIM, J. et al. Silk Peptide Intake Increases Fat Oxidation at Rest in Exercised Mice. **J Nutr Sci Vitaminol**, v.59, p. 250–255, 2013

KIM, J.; LIM, K. Relationship between FAT/CD36 Protein in Skeletal Muscle and Whole-body Fat Oxidation in Endurance-trained Mice. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 48–52, 2016.

KIRKWOOD, S.; PACKER, L.; BROOKS, G. Effects of endurance training on a mitochondrial reticulum. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 255, n. 1, p. 80–88, 1987.

KLONER, R. A. et al. Effect of propranolol on mitochondrial morphology during acute myocardial ischemia. **The American Journal of Cardiology**, v. 41, n. 5, p. 880–886, 1978.

KOH, J. et al. TFAM enhances fat oxidation and attenuates high fat diet induced. p. 1–54, 2019.

KONG, D. et al. Overexpression of mitofusin 2 improves translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle of high-fat diet-fed rats through AMP-activated protein kinase signaling. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 1, p. 205–210, 2013.

LAHERA, V. et al. Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension and Obesity. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 2, 2017.

LAZARTIGUES, E.; FENG, Y.; LAVOIE, J. L. The Two fACEs of the Tissue Renin-Angiotensin Systems: Implication in Cardiovascular Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 12, p. 1231–1245, 2007.

LECKA-CZERNIK, B.; ROSEN, C. J. Energy Excess, Glucose Utilization, and Skeletal Remodeling: New Insights. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 8, p. 1356–1361, 2015.

LEDUC-GAUDET, J. P. et al. The impact of a short-term high-fat diet on mitochondrial respiration, reactive oxygen species production, and dynamics in oxidative and glycolytic skeletal muscles of young rats. **Physiological Reports**, v. 6, n. 4, 2018.

LEE, S. et al. Effects of chronic high-fat feeding on skeletal muscle mass and function in middle-aged mice. **Aging Clin Exp Res**, v. 27, n. 4, p. 413-411, 2015.

LEE, H.; YOON, Y. Mitochondrial fission and fusion. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 6, p. 1725–1735, 2016.

LI, J. et al. A ketogenic amino acid rich diet benefits mitochondrial homeostasis by altering the AKT/4EBP1 and autophagy signaling pathways in the gastrocnemius and soleus. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1862, n. 7, p. 1547–1555, 2018.

LIM, C. T.; KOLA, B.; KORBONITS, M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 2, p. 87–97, 2010.

LIU, C. et al. Angiotensin-(1–7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. **Acta Diabetol**, v. 49, n. 4, p. 291–299, 2012.

LU, H. et al. Structure and functions of angiotensinogen. **Hypertension Research**, v. 39, n. 10, p. 492–500, 2016.

LUNDBY, A. K. et al. Exercise training increases skeletal muscle mitochondrial volume density by enlargement of existing mitochondria and not de novo biogenesis. **Acta Physiologica**, v. 222, n. 1, 2018.

MACHADO, C. E. P.; CAPUTO, F.; DENADAI, B. S. Intensidade de exercício correspondente ao VO₂max durante o ciclismo: análise de diferentes critérios em indivíduos treinados. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 18,

MACINNIS, M. J. et al. Superior mitochondrial adaptations in human skeletal muscle after interval compared to continuous single-leg cycling matched for total work. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 9, p. 2955–2968, 2017.

MALEK, M. H. et al. Similar skeletal muscle angiogenic and mitochondrial signalling following 8 weeks of endurance exercise in mice: discontinuous versus continuous training. **Experimental physiology**, v. 98, n. 3, p. 807–18, 2013.

MALIN, S. K.; KIRWAN, J. P. Fasting hyperglycaemia blunts the reversal of impaired glucose tolerance after exercise training in obese older adults. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 14, n. 9, p. 835–841, 2012.

MANIO, M.; MATSUMURA, S.; INOUE, K.; Low-fat diet, and medium-fat diets containing coconut oil and soybean oil exert different metabolic effects in untrained and treadmill-trained mice. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v.15, n.1, p.1-16, 2018.

MARCUS, Y.; SHEFER, G.; STERN, N. Adipose tissue renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 378, n. 1–2, p. 1–14, 2013

MORIMOTO, H. et al. Angiotensin 1–7 stimulates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 314, n. 2, p. E131–E138, 2017.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica Básica. 4. ed. 2015.

MATAVELLI, L.; SIRAGY, H. AT₂ Receptor activities and pathophysiological implications. **J Cardiovasc Pharmacol** v. 65, n. 3, p. 226–232, 2015.

MAZZEO, R. et al. Exercise and Physical Activity for Older Adults. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 30, n. 6, p. 992–1008, 1998.

MAZZUCATTO, F. et al. Reversal of metabolic adaptations induced by physical training after two weeks of physical detraining. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 8, p. 2000–2008, 2014.

MCCARRON, J. G. et al. From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle. **Journal of Vascular Research**, v. 50, n. 5, p. 357–371, 2013.

MEHAN, R. S. et al. Matrix metalloproteinase-9 deficiency results in decreased fiber cross-sectional area and alters fiber type distribution in mouse hindlimb skeletal muscle. **Cells Tissues Organs**, v. 194, n. 6, p. 510–520, 2011.

MILLER, M. S. et al. Moderate-intensity resistance exercise alters skeletal muscle molecular and cellular structure and function in inactive older adults with knee osteoarthritis. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 4, p. 775–787, 2017.

MITSUHASHI, S. et al. Muscle choline kinase beta defect causes mitochondrial dysfunction and increased mitophagy. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 19, p. 3841–3851, 2011.

MONTERO, D.; LUNDBY, C. Refuting the myth of non-response to exercise training: ‘non-responders’ do respond to higher dose of training. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 11, p. 3377–3387, 2017.

MORALES, M. G. et al. Endotoxin-induced skeletal muscle wasting is prevented by angiotensin-(1–7) through a p38 MAPK-dependent mechanism. **Clinical Science**, v. 129, p. 461–476, 2015.

MOTTA-SANTOS, D. et al. Effects of ACE2 deficiency on physical performance and physiological adaptations of cardiac and skeletal muscle to exercise. **Hypertension Research**, v. 39, n. 7, p. 506–512, 2016.

MOUSA, T.; LIU, D.; CORNISH, K. Exercise training enhances baroreflex sensitivity by an angiotensin II-dependent mechanism in chronic heart failure. **J Appl Physiol**, v. 104, n. 3, p. 616–624, 2008.

MULLER, C. R. et al. Aerobic exercise training prevents kidney lipid deposition in mice fed a cafeteria diet. **Life Sciences**, v. 211, n. April, p. 140–146, 2018.

MUÑOZ, M. C. et al. The Mas receptor mediates modulation of insulin signaling by angiotensin-(1-7). **Regulatory Peptides**, v. 177, n. 1–3, p. 1–11, 2012.

MUÑOZ, M. C.; GIANI, J. F.; DOMINICI, F. P. Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas. **Regulatory Peptides**, v. 161, n. 1–3, p. 1–7, 2010.

MURAKAMI, T. et al. Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1381, n. 1, p. 113–122, 1998.

MURIAS, J. M. et al. Adaptations in capillarization and citrate synthase activity in response to endurance training in older and young men. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 66, n. 9, p. 957–964, 2011.

MUSI, N. et al. Functional role of AMP-activated protein kinase in the heart during exercise. **FEBS Letters**, v. 579, n. 10, p. 2045–2050, 2005.

NELSON, D. L. *Princípios da bioquímica*. 3. ed. 2002.

NETZ, Y. et al. Aerobic fitness and multidomain cognitive function in advanced age. **International psychogeriatrics / IPA**, v. 23, n. 1, p. 114–24, 2011.

NIELSEN, J. et al. Increased subsarcolemmal lipids in type 2 diabetes: effect of training on localization of lipids, mitochondria, and glycogen in sedentary human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 3, p. 706–713, 2010.

O'NEILL, H. M.; HOLLOWAY, G. P.; STEINBERG, G. R. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: Implications for obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 366, n. 2, p. 135–151, 2013.

OGIHARA, T. et al. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. **Hypertension**, v. 40, n. 6, p. 872–879, 2002.

OH, Y.; KIM, J.; PARK, B. Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1–7). **Peptides**, v. 37, n. 1, p. 79–85, 2012.

PAES, L. S. et al. Oxygen uptake, respiratory exchange ratio, or total distance: A comparison of methods to equalize exercise volume in wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 8, p. 1–8, 2016.

PAIZIS, G. et al. Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2. **Gut**, v. 54, n. 12, p. 1790–1796, 2005.

PANDEY, A. et al. Differential regulation of angiotensin converting enzyme 2 and

nuclear factor- κ B by angiotensin II receptor subtypes in type 2 diabetic kidney. **Biochimie**, v. 118, p. 71–81, 2015.

PATTANAKUHAR, S. et al. Combined exercise and calorie restriction therapies restore contractile and mitochondrial functions in skeletal muscle of obese–insulin resistant rats. **Nutrition**, v. 62, p. 74–84, 2019.

PATTI, M. E.; CORVERA, S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 3, p. 364–395, 2010.

PERRY, C. et al. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. **J. Physiol**, v. 588, n. 23, p. 4795–4810, 2010.

PETROSINO, J. M. et al. Graded maximal exercise testing to assess mouse cardio-metabolic phenotypes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–21, 2016.

PINHO, R. A. et al. High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 110, n. July, p. 381–389, 2017.

PICARD, M.; WHITE, K.; TURNBULL, D.; Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. **J Appl Physiol**, v. 114, p. 161–171, 2013.

POOLE, D. C.; MATHIEU-COSTELLO, O. Relationship between Fiber Capillarization and Mitochondrial Volume Density in Control and Trained Rat Soleus and Plantaris Muscles. **Microcirculation**, v. 3, n. 2, p. 175–186, 1996.

POWERS, S. K.; RADAK, Z.; JI, L. L. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 18, p. 5081–5092, 2016.

PRASANNARONG, M.; SANTOS, F. R.; HENRIKSEN, E. J. ANG-(1-7) reduces ANG II-induced insulin resistance by enhancing Akt phosphorylation via a Mas receptor-dependent mechanism in rat skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 426, n. 3, p. 369–373, 2012.

RABOL, R. et al. Reversal of muscle insulin resistance with exercise reduces postprandial hepatic de novo lipogenesis in insulin resistant individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 33, p. 13705–9, 2011.

RAMBOLD, A.; COHEN, S.; SCHWARTZ, L.-. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy and mitochondrial fusion dynamics Angelika. **Dev Cell**, v. 32, n. 6, p. 678–692, 2015.

RANDLE, P. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diabetes Metab Rev**, v. 14, n. 4, p. 263–283, 1998.

REIMERS, C. D.; KNAPP, G.; REIMERS, A. K. Does physical activity increase life expectancy? A review of the literature. **Journal of Aging Research**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

ROCKL, K. et al. Skeletal muscle adaptation to exercise training: AMP-Activated protein kinase mediates muscle fiber type shift. **Diabetes**, v. 56, n. August, p. 2062–2069, 2007.

RODRIGUEZ, J. et al. Endurance training attenuates catabolic signals induced by TNF- α in muscle of mice. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 48, n. 2, p. 227–234, 2016.

ROY, M. et al. Mitochondrial Division and Fusion in Metabolism. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 33, p. 111–118, 2015.

ROSENO, S. Short-term, high-fat diet accelerates disuse atrophy and protein degradation in a muscle-specific manner in mice. **Nutrition & Metabolism**, v. 12 n. 1 p. 1-39, 2015.

SAKAMOTO, K.; HOLMAN, G. D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 1, p. E29–E37, 2008.

SALES, J. M.; RESURRECCION, A. V. A. Resveratrol in Peanuts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 6, p. 734–770, 2014.

SALIN, K. et al. Variation in the link between oxygen consumption and ATP production , and its relevance for animal performance. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.282, p. 1-9, 2015.

SAMAAN, M. C. et al. Endurance interval training in obese mice reduces muscle inflammation and macrophage content independently of weight loss. **Physiological reports**, v. 2, n. 5, p. 1–13, 2014.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: **Comparison to High-Fat Diet. Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109–1117, 2011.

SANDERS, M. J. et al. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. **Biochemical Journal**, v. 403, n. 1, p. 139–148, 2007.

SANTORO, C. et al. Exercise training alters skeletal muscle mitochondrial morphometry in heart failure patients. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 9, n. 6, p. 377–381, 2002.

SANTOS, R. A. S.; FRÉZARD, F.; FERREIRA, A. J. Angiotensin- (1-7): Blood , Heart , and Blood Vessels. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, v. 3, p. 383–391, 2005.

SANTOS, R.; SIMOES E SILVA, A.; MARIA, C. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003.

SANTOS, S. et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 340–347, 2007.

SCARPULLA, R. C. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. **Gene**, v. 286, n. 1, p. 81–89, 2002.

SCARPULLA, R. C. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, n. 4, p. 673–683, 2006.

SCHRAUWEN, P. et al. Fiber type dependent upregulation of human skeletal muscle UCP2 and UCP3 mRNA expression by high-fat diet. **International Journal of Obesity**, v. 25, n. 4, p. 449–456, 2001.

SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B. et al. Intramyocellular lipid content and molecular adaptations in response to a 1-week high-fat diet. **Obesity Research**, v. 13, n. 12, p. 2088–2094, 2005.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 2, p. 171–176, 2000.

SILVA, S. D. et al. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–19, 2017.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SITPARAN, P. K. et al. Contractile properties of slow and fast skeletal muscles from protease activated receptor-1 null mice. **Muscle and Nerve**, v. 50, n. 6, p. 991–998, 2014.

SIU, P. M. et al. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. **Journal of applied physiology**, v. 94, n. 2, p. 555–60, 2003.

SIVITZ, W. I.; YOREK, M. A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & redox signaling**. v. 12, n. 4, p. 537–577, 2010.

SMITH, P. M. et al. AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet. **Frontiers in psychology**, v. 5, p. 1–6, 2014.

SONG, G. Y. et al. Similar changes in muscle lipid metabolism are induced by chronic high-fructose feeding and high-fat feeding in C57BL/J6 mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 12, p. 1011–1018, 2012.

STEPHENSON, E. J. et al. Skeletal muscle respiratory capacity is enhanced in rats consuming an obesogenic Western diet. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 12, p. E1541–E1549, 2012.

SUGA, T. et al. Combination of exercise training and diet restriction normalizes limited exercise capacity and impaired skeletal muscle function in diet-induced diabetic mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 68–80, 2014.

SUZUKI, J. Short-duration intermittent hypoxia enhances endurance capacity by improving muscle fatty acid metabolism in mice. **Physiological Reports**, v. 4, n. 7, p. 1–11, 2016.

SUZUKI, J. Endurance performance is enhanced by intermittent hyperbaric exposure via up-regulation of proteins involved in mitochondrial biogenesis in mice. **Physiological reports**, v. 5, n. 15, p. e13349, 2017.

SWIFT, D. L.; JOHANNSEN, N. M.; LAVIE, C. J. The Role of Exercise and Physical Activity in Weight Loss and Maintenance. **Prog, Cardiovascular Dis**, v. 56, n. 4, p. 441–447, 2015.

TABONY, M.; YOSHIDA, T.; SUKHANOV, S. Angiotensin II upregulates PP2C α and inhibits AMPK signaling and energy balance leading to skeletal muscle wasting. **Hypertension**, v. 58, n. 4, p. 643–649, 2012.

TAKADA, S. et al. Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. **Journal of applied physiology**, v. 114, p. 844–57, 2013.

TAKESHITA, H. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 deficiency accelerates and angiotensin 1-7 restores age-related muscle weakness in mice. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 5, p. 975–986, 2018.

TAMURA, Y. et al. Postexercise whole body heat stress additively enhances endurance training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle. **Am J physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 307, n. 7, p. R931–R943, 2014.

TARNOPOLSKY, M. A. et al. Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 3, p. R1271–R1278, 2007.

TAYLOR, E. et al. Endurance training increases skeletal muscle LKB1 and PGC-1alpha protein abundance: effects of time and intensity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 280, p. 960-968, 2005.

THEILEN, N. T.; KUNKEL, G. H.; TYAGI, S. C. The Role of Exercise and TFAM in Preventing Skeletal Muscle Atrophy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 9, p. 2348–2358, 2017.

TILOKANI, L. et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. **Essays in Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 341-360, 2018.

TIPNIS, S. R. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **Journal Biol Chem**, v. 275, n. 33, p. 238–243, 2000.

VARGAS-ORTIZ, K. et al. Aerobic training but no resistance training increases SIRT3 in skeletal muscle of sedentary obese male adolescents. **European Journal of Sport Science**, v. 18, n. 2, p. 226–234, 2018.

VEITENHANSL, M.; STEGNER, K.; HIERL, F. 40th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetologia**, v. 47, n. September, p. 1–463, 2004.

VISHWANATH, V. A. Fatty acid beta-oxidation disorders: A brief review. **Annals of Neurosciences**, v. 23, n. 1, p. 51–55, 2016.

WANG, X. et al. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. **Endocrinology**, v. 149 n. 9 p. 4160-4168, 2006.

WASSERMAN, K.; MCILROY, M. B. Detecting the Threshold of Anaerobic Metabolism in Cardiac Patients During Exercise. **The American journal of cardiology**, v. 14, p. 844–852, 1964.

WATANABE, T. et al. Roles of mitochondrial fragmentation and reactive oxygen species in mitochondrial dysfunction and myocardial insulin resistance. **Experimental Cell Research**, v. 323, n. 2, p. 314–325, 2014.

WATSON, P. M. et al. Differential regulation of leptin expression and function in A / J vs . C57BL / 6J mice during diet-induced obesity. **Society**, p. 356–365, 2000.

WEERATUNGA, P. et al. Per capita sugar consumption and prevalence of diabetes mellitus – global and regional associations. **BMC Public Health**, v. 14, n. 186, p. 1–6, 2014.

WILLIAMS, A.; RAYSON, M.; JUBB, M. The ACE gene and muscle performance. **Nature**, v. 403, n. 6770, p. 614, 2000.

WILLIAMS, E. P. et al. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. **Current obesity reports**, v. 4, n. 3, p. 363–370, 2015.

WILLIAMS, I. M. et al. **Chronic angiotensin-(1-7) improves insulin sensitivity in high-fat fed mice independent of blood pressureHypertension**, 2016. .

WOJEWODA, M. et al. Running performance at high running velocities is impaired but VO₂máx and peripheral endothelial function are preserved in IL-6-/- mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–10, 2014.

WOJEWODA, M. et al. Skeletal muscle response to endurance training in IL-6-/- mice. **International Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 14, p. 1163–1169, 2015.

WU, Z. et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell**, v. 98, n. 1, p. 115–124, 1999.

YANG, S. Y.; HE, X. Y.; SCHULZ, H. 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease. **FEBS Journal**, v. 272, n. 19, p. 4874–4883, 2005.

YOKOTA, T. et al. Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 3, p. H1069–H1077, 2009.

YOON, Y. Mitochondrial dynamics in diabetes. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 3, p. 439–57, 2011.

ZELEZNIAK, A. et al. Metabolic network topology reveals transcriptional regulatory signatures of type 2 diabetes. **PLoS Computational Biology**, v. 6, n. 4, 2010.

ZHOU, Q. et al. Evidence for adipose-muscle cross talk: Opposing regulation of muscle proteolysis by adiponectin and fatty acids. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, 5696-5705, 2007.

ZIMMERMAN, D.; BURNS, K. Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. **Clin Sci**, v. 123, n. 6, p. 333–346, 2012.