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

VANESSA CRISTINA FORTUNATO LIMA

**Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas na prevenção da doença hepática gordurosa não
alcoólica por meio do treinamento físico aeróbio**

São Paulo

2017

VANESSA CRISTINA FORTUNATO LIMA

**Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas na prevenção da doença hepática gordurosa não
alcoólica 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, Saúde e Lazer

Orientadora:

Profa. Dra. Fabiana de Sant'Anna Evangelista

São Paulo

2017

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)

Lima, Vanessa Cristina Fortunato

Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas na prevenção da doença hepática gordurosa não alcoólica por meio do treinamento físico aeróbio /

Vanessa Cristina Fortunato Lima ; orientadora, Fabiana de Sant'Anna Evangelista. – 2017

76 f.

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

1. Treinamento aeróbio. 2. Sistema renina-angiotensina. 3. Fígado gorduroso. I. Evangelista, Fabiana de Sant'Anna, orient.
II. Título

CDD 22.ed. – 613.71

Nome: LIMA, Vanessa Cristina Fortunato

Título: Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas na prevenção da doença hepática gordurosa não alcoólica 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, Saúde e Lazer

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

À Profa. Fabiana S. Evangelista, pelo amor, vontade e dedicação que tem a pesquisa, que irradia todos a sua volta. Agradeço por acreditar em mim desde a graduação e me ensinar a enfrentar todos os desafios da pesquisa com muita paciência. Agradeço pelos inúmeros conselhos de coragem, pela dedicação no meu trabalho e por todos os ensinamentos da profissão.

À Dra. Miriam Alaniz, pelos ensinamentos na bancada, que foram importantes para o meu amadurecimento.

Ao meu querido e amado irmão, Rafael, pelo apoio, incentivo e carinho.

Aos meus pais, Solivar e Weidner, pessoas essenciais na minha vida. Agradeço por estarem sempre presentes na minha vida e fazerem tudo por mim.

Ao meu namorado, Fabio, pelo amor, companherismo e pela torcida para que, no final, tudo dê certo.

À toda minha família, meus avós, tias e tios que sempre estiveram por perto de mim, me apoiando em todas as minhas escolhas profissionais, sempre me enchendo de muito carinho e amor.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, por viabilizar a execução desse projeto em seu laboratório.

Aos meus amigos de fora e dentro da área acadêmica, pela amizade e incentivo. Em especial as doutorandas Anna Laura e Cynthia Muller e o mestrando Bruno Vechiatto.

Ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, onde foi realizada parte dos experimentos desse projeto. Agradeço aos funcionários e técnicos pelo suporte e auxílio.

Ao laboratório de Biomedicina da Escola de Artes Ciências e Humanidades e a minha Universidade, querida, Escola de Artes Ciências e Humanidades.

À Secretaria de Pós-Graduação da Escola de Artes Ciências e Humanidades, pelo suporte e atendimento.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

LIMA, Vanessa Cristina Fortunato. **Papel da alça ECA2/Ang 1-7/Mas na prevenção da doença hepática gordurosa não alcoólica por meio do treinamento físico aeróbio.** 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Versão original.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) consiste na alteração morfofisiológica do fígado decorrente do acúmulo de lipídios nos hepatócitos. O desenvolvimento de DHGNA pode estar associado à obesidade e o diabetes tipo 2, e um dos possíveis mecanismos mediadores é a hiperatividade da alça ECA/Ang II/AT1 do sistema renina angiotensina (SRA). Por outro lado, evidências mais recentes mostraram que a ativação da alça ECA2/Ang 1-7/Mas do SRA age na direção oposta, podendo atenuar as manifestações clínicas das doenças metabólicas. O treinamento físico aeróbio (TFA) tem sido amplamente recomendado para a prevenção e o tratamento de doenças metabólicas, inclusive da DHGNA, e parte das respostas benéficas podem estar associadas com a melhora do metabolismo oxidativo. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar se a prevenção da DHGNA por meio do TFA é mediada pela melhora do metabolismo hepático associada à ativação da alça do SRA ECA2/ Ang1-7/ Mas. Para isso, camundongos C57BL/6 foram separados em grupos (n=10/grupo) sedentários (SED) alimentados com dieta normocalórica (NO) ou de cafeteria (CAF) (SED-NO e SED-CAF, respectivamente) e submetidos ao TFA alimentados com dieta NO ou CAF (TF-NO e TF-CAF, respectivamente). O grupo SED-CAF apresentou maior ganho de peso corporal, conteúdo de lipídios e de IL-6 no fígado, e o TFA previniu esses aumentos no grupo TF-CAF. Não houve diferença na concentração sérica das enzimas ALT e AST, na expressão de genes relacionados com o metabolismo lipídico e na expressão das proteínas AMPK, PGC1- α , SIRT-1, ACC e receptor Mas no fígado. Os grupos TF-NO e TF-CAF apresentaram maior atividade da ECA2 no soro comparados ao SED-NO e SED-CAF, porém a atividade da ECA2 e o conteúdo do peptídeo Ang1-7 não foram diferentes entre os grupos. O TF-NO apresentou menor atividade da enzima ECA no fígado comparado ao grupo TF-CAF. Coletivamente, os dados obtidos permitem afirmar que o TFA preveniu a DHGNA evidenciado pelo menor conteúdo de lipídios e citocina pró-inflamatória IL-6, no entanto, essa resposta foi independente de mudanças na expressão de genes e de proteínas reguladoras do metabolismo hepático associada à alça do SRA ECA2/ Ang1-7/ Mas.

Palavras chaves: Doença hepática gordurosa não alcoólica. Angiotensina 1-7. Dieta de cafeteria. Treinamento físico aeróbio.

ABSTRACT

LIMA, Vanessa Cristina Fortunato. **Role of the ACE2/Ang 1-7/Mas in the prevention of non-alcoholic fatty liver disease through aerobic physical training.** 2017. 76 f. Dissertation (Master of Science) - School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2017. Original version.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) consists in the morphophysiological alteration of the liver due to the accumulation of lipids in the hepatocytes. The development of NAFLD may be associated with obesity and type 2 diabetes, and one of the possible mediating mechanisms is the hyperactivity of the ACE/Ang II/AT1 axis of the renin angiotensin system (RAS). On the other hand, evidence have shown that the activation of the ACE2/Ang 1-7/Mas have opposite effect, being able to attenuate clinical manifestations of the metabolic diseases. Aerobic physical training (APT) has been widely recommended for the prevention and treatment of metabolic diseases, including NAFLD, and some of the beneficial responses may be associated with improved oxidative metabolism. Thus, the aim of this study was to investigate whether the prevention of NAFLD by APT is mediated by the improvement of the metabolism associated with the activation of the RAS ACE2/Ang1-7/Mas axis. For this, C57BL/6 mice were separated into sedentary groups (SED) fed normocaloric (NO) or cafeteria (CAF) diet (SED-NO and SED-CAF, respectively) and trained with APT fed NO or CAF diet (TF-NO and TF-CAF, respectively). The SED-CAF group presented higher body weight gain, lipid and IL-6 content in the liver, and APT prevented these increases in the TF-CAF group. No differences were observed in the concentration of ALT and AST enzymes, in the expression of genes related to lipid metabolism and in the expression of AMPK, PGC1- α , SIRT-1, ACC and receptor Mas in the liver. TF-NO and TF-CAF groups had higher serum ACE2 activity compared to SED-NO and SED-CAF, however ACE2 activity and Ang1-7 content were not different among groups. TF-NO showed lower ACE activity in the liver compared to the TF-CAF group. Collectively, the results showed that APT prevented NAFLD evidenced by the lower lipid content and pro-inflammatory cytokine IL-6, however, this response is independent of changes in gene expression and in hepatic metabolism regulatory proteins expression associated with the SRA ACE2/Ang1-7/Mas axis.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease. Angiotensin 1-7. Cafeteria diet. Aerobic physical training.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Obesidade, resistencia à insulina e danos hepático.....	22
Figura 2 Sistema renina angiotensina e metabolismo hepático	25
Figura 3 Desenho experimental do projeto	30
Figura 4 Tempo total percorrido durante teste de tolerância ao esforço físico em esteira antes do protocolo experimental.....	38
Figura 5 Tempo total percorrido durante teste de tolerância ao esforço físico em esteira pós-treinamento físico.....	38
Figura 6 Evolução de peso corporal durante o protocolo experimental.....	39
Figura 7 Ganho de peso corporal durante 8 semanas (g).....	39
Figura 8 Peso dos depósitos gordura subcutâneo (TAB-SC), periepididimal (TAB-PE) e retroperitoneal (TAB-RP) em valores absolutos.....	40
Figura 9 Peso do fígado (g).....	40
Figura 10 Média do consumo alimentar diário em gramas (A), em quilocalorias (B) e (C) consumo alimentar semanal, durante o protocolo experimental.....	41
Figura 11 Conteúdo de lipídio hepático	42
Figura 12 Fotomicrografias representativas de cortes histológicos hepáticos corados com Oil Red O.....	43
Figura 13 Conteúdo de IL-6 hepático.....	44
Figura 14 Fotomicrografias representativas de cortes histológicos hepáticos. Visualização da concentração de IL-6 no aumento 40x.....	44

Figura 15	Concentração sérica de AST dos animais após protocolo experimental..	45
Figura 16	Concentração sérica de ALT dos animais após protocolo experimental...	45
Figura 17	Expressão proteica da t-AMP-K (A), p-AMP-K (Thr 172) (B) e razão p-AMPK/t-AMPK.....	47
Figura 18	Expressão proteica da PGC1- α	48
Figura 19	Expressão proteica da SIRT-1.....	48
Figura 20	Expressão proteica da t-ACC (A) e p-ACC (Ser 79) (B). p-ACC/t-ACC (C).....	49
Figura 21	Atividade enzimática da ECA 2 no soro.....	50
Figura 22	Atividade enzimática da ECA2 no fígado.....	50
Figura 23	Atividade enzimática da ECA no fígado.....	51
Figura 24	Concentração de Ang 1-7 no fígado.....	51
Figura 25	Expressão protéica do receptor Mas.....	52

LISTA DE TABELA

Página

Tabela 1	Composição nutricional e valor energético das dietas (porção de 45g).....	30
Tabela 2	<i>Primers</i> para amplificação dos genes	36
Tabela 3	Expressão de RNAm no fígado	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA Carboxilase
ALT	Alanina Transaminase
AngII	Angiotensina II
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	Proteína Ativada por AMP
ApoB	Apolipoproteína B
AST	Aspartato Transaminase
ATP	Trifosfato de Adenosina
AT1	Receptor AT1
AT2	Receptor AT2
BSA	Bovine Serum Albumin
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CoA	Coenzima A
CPT-1	Carnitina Palmitoil Transferase 1
CoA	Coenzima A
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2.
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA 2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EHNA	Esteatose Hepática Não Alcoólica
FAS	Ácido Graxo Sintase
IMC	Índice de Massa Corporal
Mas	Receptor Mas

MTP	Proteína Microsomal de Transferência de Lipídios
PGC1 α	Coativador 1 Alfa do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma
PPAR α	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Alfa
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
SIRT-1	Sirtuina 1
SRA	Sistema Renina Angiotensina
SREBP-1c	Proteínas Ligantes aos Elementos Regulados por Esteróides
TAB	Tecido Adiposo Branco
TFA	Treinamento Físico Aeróbio
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VLDL	Lipoproteína de baixa densidade
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

Unidades

%	Porcentagem
mg	Miligrama
g	Gramma
°C	Grau Celsius
h	Hora
kCal	Quilocaloria
km	Quilometro
min	Minuto
rpm	Rotação por minuto

μL	Microlitro
μm	Micrometro
M	Mol
μM	Micromol
nm	Nanometro
MM	Massa Molar
ng	Nanograma
mM	Milimolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	FÍGADO E DOENÇAS METABÓLICAS.....	19
2.2	SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E METABOLISMO HEPÁTICO...	22
2.3	TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO E PREVENÇÃO DE DOENÇAS METABÓLICAS.....	25
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	GERAL.....	28
3.2	ESPECÍFICOS.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	AMOSTRA.....	29
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL DO PROJETO.....	29
4.3	DIETAS ALIMENTARES.....	30
4.4	PROTOCOLO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO.....	31
4.5	TESTE DE ESFORÇO FÍSICO MÁXIMO.....	31
4.6	CONSUMO DE RAÇÃO.....	32
4.7	AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	32
4.8	PROCEDIMENTO DE MORTE E COLETAS.....	32
4.9	DEPOSIÇÃO DE LIPÍDIO.....	32
4.10	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	33
4.11	DOSAGENS SÉRICAS AST E ALT.....	33

4.12	DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ECA E DA ECA 2	34
4.13	QUANTIFICAÇÃO DA ANGIOTENSINA 1-7.....	34
4.14	EXPRESSÃO GÊNICA.....	35
4.15	QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....	36
4.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS.....	37
5.1	CAPACIDADE FÍSICA.....	37
5.2	COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	38
5.3	CONSUMO DE RAÇÃO.....	41
5.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL.....	42
5.4.1	Deposição de lipídios.....	42
5.4.2	Conteúdo hepático de IL-6.....	43
5.4.3	Dosagens sérica AST e ALT.....	45
5.5	EXPRESSÃO GÊNICA.....	45
5.6	EXPRESSÃO PROTÉICA.....	46
5.7	COMPONENTES DO SRA.....	50
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma das doenças do fígado mais comuns associadas à dislipidemia, hiperglicemia e inflamação (VERHAEGH *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017), com prevalência estimada em aproximadamente 20% a 30% dos adultos com obesidade e resistência à insulina (AKINKUQBE *et al.*, 2017). A DHGNA inicia-se com o acúmulo de triglicerídeos e outros lipídios nas células do fígado, as quais são denominadas hepatócitos. As alterações morfofisiológicas presentes na DHGNA são reversíveis (MOURA *et al.*, 2011; REMEDIO *et al.*, 2011), no entanto, em 10% dos casos de DHGNA, o excessivo acúmulo de lipídios progride para a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), que é caracterizada por infiltração de células inflamatórias seguida de fibrose hepática (KRISHNAN *et al.*, 2017). A EHNA pode, em alguns casos, progredir para cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e consequente falência do órgão (HIGUCHI *et al.*, 2011; AUGUSTIN *et al.*, 2017; DI MARTINO *et al.*, 2017).

A investigação dos mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento e na progressão da DHGNA 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 da hiperatividade da alça clássica do SRA composta pela enzima conversora de angiotensina (ECA), o peptídeo Angiotensina II (Ang II) e o receptor AT1 (ECA/Ang II/AT1) com o desenvolvimento de danos morfofuncionais no tecido hepático. A descoberta de uma alça diferente do SRA que inclui a ECA 2 (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 *et al.*, 2000; TIPNIS *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2003), proporcionou uma nova visão do SRA no contexto das doenças metabólicas e cardiovasculares. De fato, a Ang 1-7 pode agir na direção oposta da Ang II, promovendo diminuição da intolerância à glicose, da resistência à insulina e da DHGNA induzida por dieta hiperlipídica (ZHANG *et al.*, 2014; FRANTZ *et al.*, 2017).

As causas da DHGNA são diversas, no entanto, o estilo de vida composto por hábitos alimentares com excessiva ingestão de açúcares e gorduras saturadas associado com a inatividade física, são fatores de risco para o desenvolvimento e a progressão dos danos morfofuncionais no fígado (KAWAGUCHI *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2017). WANG *et*

al. (2016) demonstraram que dieta com alto teor de gordura está associada com o aumento da expressão de 150 genes envolvidos no metabolismo dos lipídios, inflamação e estresse oxidativo. Entretanto, o treinamento físico aeróbio (TFA) realizado cinco vezes por semana, durante três meses, pode exercer efeito protetor e reduzir o dano tecidual hepático, reduzir a insulinemia e os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (BHAT *et al.*, 2012; SCHULTZ *et al.*, 2012). Por isso, o TFA tem sido amplamente recomendado como parte do tratamento e prevenção de prejuízos metabólicos (BACCHI *et al.*, 2013; LINDEN *et al.*, 2014; POETA *et al.*, 2017), pois aumenta a sensibilidade à insulina (BHAT *et al.*, 2012), melhora a oxidação de lipídios, diminui o peso corporal e os danos morfofuncionais hepáticos (BOTEZELLI *et al.*, 2010; KENNEALLY *et al.*, 2017).

Embora seja conhecida a relação entre a DHGNA e os distúrbios metabólicos na obesidade e no diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), o papel do SRA no desenvolvimento da DHGNA e a importância do TFA para a prevenção e o tratamento de distúrbios metabólicos, uma lacuna de conhecimento ainda existe sobre a contribuição do SRA na prevenção dos prejuízos morfofuncionais hepáticos por meio do TFA. Dessa forma, o presente estudo buscou testar a hipótese de que a prevenção da DHGNA por meio do TFA é mediada pela melhora do metabolismo hepático associada à ativação da alça do SRA ECA2/ Ang1-7/Mas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FÍGADO E DOENÇAS METABÓLICAS

O fígado é um órgão fundamental para o controle do metabolismo energético corporal, isso porque nesse órgão ocorre a síntese, armazenamento e a quebra de glicogênio, além de síntese do colesterol e lipogênese (produção de triacilgliceróis). No entanto, esse controle é prejudicado quando os hepatócitos começam apresentar danos na sua função (BHAT *et al.*, 2012).

De acordo com GANZ *et al.* (2014), 75% da população ocidental obesa são afetadas por doenças no fígado. A diminuição na capacidade dos adipócitos em armazenar, de forma eficiente, o excesso de nutrientes e lipídios como os triglicerídeos, e

o estado crônico de inflamação pode estar diretamente associado ao desenvolvimento de DHGNA. O aumento na circulação de ácidos graxos livres e o acúmulo de lipídios em tecidos sensíveis à insulina como o músculo esquelético e o fígado, podem induzir dano tecidual hepático e resistência à insulina (NEGRIN *et al.*, 2014). TOONEN *et al.* (2016) relacionaram o desenvolvimento da DHGNA com a resistência à insulina no fígado, enfatizando a relação dessas doenças metabólicas na evolução dos prejuízos morfofuncionais hepático. De fato, EBERTZ *et al.* (2014) observaram que ratos obesos apresentavam hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina, hipertrigliceridemia e DHGNA.

O aumento na deposição de lipídios no fígado é resultante tanto do aumento de proteínas lipogênicas quanto da diminuição de proteínas oxidativas (LIU *et al.*, 2017). O receptor nuclear ativado por proliferador de peroxisoma gamma (PPAR- γ) é o receptor central na manutenção da homeostase de glicose e lipídios. Esse receptor regula a transcrição de genes envolvidos na lipogênese, como o fator de transcrição de proteínas ligantes aos elementos regulados por esteróides (SREBP1c) e, genes relacionados ao transporte de lipídios como a proteína microssomal de transferência de lipídios-MTP (MORAN-SALVADOR *et al.*, 2011; TANAKA *et al.*, 2017). O SREBP1c é responsável pela biossíntese de colesterol, ácidos graxos, triglicerídeos e diferenciação dos adipócitos, e quando elevado no fígado, favorece a síntese de lipídios através da ativação de genes lipogênicos como a acetil-CoA carboxilase (ACC forma ativa) e a ácido graxo sintase (FAS) (SCHULTZ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016). AHN *et al.* (2014) avaliaram amostras de sangue de 40 pacientes com DHGNA e encontraram concentrações de SREBP1c maiores comparados ao grupo controle.

A MTP é uma proteína chave envolvida no mecanismo de eliminação intra-hepático de lipídios, com papel fundamental na montagem e secreção de lipoproteínas através da produção de VLDL (BOUCHER *et al.*, 2015). Localizada no retículo endoplasmático dos hepatócitos e enterócitos (células do intestino), também desempenha papel importante no desenvolvimento da DHGNA. A MTP transfere colesterol livre, fosfolípidos, triglicerídeos e ésteres de colesterol para a apolipoproteína B (apoB) e juntas coordenam a formação de VLDL. A apoB atinge uma conformação pré-VLDL e subsequente formação de VLDL pela ação da MTP (HIGUCHI *et al.*, 2011). O estudo de MOYA *et al.* (2012) mostrou aumento da MTP no fígado de pacientes com DHGNA.

Nesse mesmo artigo, em uma segunda análise feita com ratos alimentados durante 7 semanas com uma dieta com deficiência de metionina e colina, foi observado o mesmo aumento da MTP associado à DHGNA comparado aos ratos controles.

Já a diminuição em proteínas oxidativas como o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR- α) e a proteína ativada por AMP (AMPK) reduzem o potencial de oxidação de lipídios, comprometendo a homeostase lipídica hepática, aumentando os estoques energéticos do tecido (KIM *et al.*, 2014). No estudo de LIU *et al.* (2017), camundongos C57BL/6 tratados com rutina (flavonóide natural que combate o estresse oxidativo e regula o metabolismo lipídico) melhoraram a expressão de PPAR- α e carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) e, reduziram a expressão de SREBP1c e ACC. Quando ativado, PPAR- α aciona a CPT1 que está associada ao aumento do número de mitocôndrias, oxidação de lipídios, diminuição da gliconeogênese e lipogênese *de novo*. Esses resultados mediarão a redução de peso corporal, contribuindo para o tratamento da resistência à insulina e da DHGNA (VEIGA *et al.*, 2017).

O acúmulo intracelular de lipídios e a formação de gotículas lipídicas nos hepatócitos podem ativar macrófagos e promover aumento das citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina 6 (IL-6) e o factor de necrose tumoral - alfa (TNF- α), os quais desempenham papel significativo no desenvolvimento da DHGNA (JORGE *et al.*, 2016; TOONEN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017). Essa inflamação está associada à progressão da DHGNA à fibrose, cirrose e doença hepática crônica (RAHMAN *et al.*, 2016). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com ampla gama de efeitos biológicos (HENNIGAR *et al.*, 2017). KURBATOVA E DUDANOVA (2017) observaram em um estudo feito com 86 humanos com DHGNA, maiores concentrações de IL-6 no sangue comparado ao grupo controle. NISHIOKADA *et al.* (2014) observaram que ratos alimentados com dieta de cafeteria por 12 semanas apresentaram maiores concentrações séricas de IL-6, além de estresse oxidativo e dano tecidual hepático. GAVITO *et al.* (2016) mostraram que a administração de IL-6 em ratos aumentou os níveis de lipídio, glicose e leptina no sangue, além de aumentar a concentração de lipídio no fígado e agravar a DHGNA. Os estudos de LEE *et al.* (2014) e EBERTZ *et al.* (2014) enfatizam a perda de peso corporal e o controle glicêmico como fatores importantes na prevenção da obesidade, da inflamação, do DM2 e de danos hepáticos, incluindo a DHGNA.

Os prejuízos morfofuncionais hepáticos podem ser identificados e monitorados por meio do aumento de marcadores séricos, tais como as enzimas aspartato transaminase (AST) e a alanina transaminase (ALT), sendo esta última mais específica (CHOOI *et al.*, 2016). De fato, MARQUES *et al.* (2010) observaram aumento de ambas as enzimas em animais alimentados com dieta hipercalórica durante 8 semanas, além de prejuízos estruturais no tecido hepático e inflamação. Interessante que, a perda de peso corporal resulta em melhora nos níveis de ALT e AST, evidenciando que a queda desses marcadores está diretamente relacionada com a mudança no estilo de vida (AL-JIFFRI *et al.*, 2013). A figura 1 resume alguns dos mecanismos fisiopatológicos da DHGNA associada à obesidade e resistência à insulina.

Figura 1. Obesidade, resistência à insulina e danos hepáticos.

2.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E METABOLISMO HEPÁTICO

O sistema renina angiotensina circulante é reconhecido como um importante regulador da pressão arterial e da homeostase eletrolítica renal (SANJULIANI *et al.*, 2011). É responsável por induzir vasoconstrição, proliferação celular de vários tecidos, regulação de processos metabólicos, hipertrofia de órgãos, retenção de sódio e liberação de aldosterona (NUNES-SILVA *et al.*, 2017). A hiperatividade do SRA tem sido, cada vez

mais, relacionada à gênese de várias doenças como a hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), insuficiência renal e DHGNA (SANJULIANI *et al.*, 2011; NUNES-SILVA *et al.*, 2017; FRANTZ *et al.*, 2017).

A Ang II é a principal molécula efetora do SRA, cuja síntese se dá por meio de reações bioquímicas sequenciais que iniciam com a clivagem do angiotensinogênio pela enzima renina, formando a angiotensina I (Ang I). Posteriormente, sob ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), a Ang I é convertida em Ang II, a qual exerce suas ações através da ligação com os receptores AT1 e AT2 (ORTZ-MELO *et al.*, 2014; NUNES-SILVA *et al.*, 2017). Quando hiperativado, o receptor AT1 causa aumento de espécies reativas de oxigênio, proliferação celular e aumento da citocina pró-inflamatória TNF- α , o que está fortemente associado com o desenvolvimento e a progressão da DHGNA (KLOET *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2016; JI Y *et al.*, 2016). A ativação do AT1 também pode contribuir para a hipertrofia dos adipócitos (YVAN-CHARVET *et al.*, 2011). A ativação do receptor AT2 desencadeia ações antagônicas às do AT1, tais como redução do estresse oxidativo e melhora da sensibilidade à insulina (KLOET *et al.*, 2010). Outros componentes do SRA foram descritos na literatura, como a molécula Ang 1-7, que é produzida a partir da Ang I e Ang II via ação da ECA2, e que por sua vez atua através do receptor Mas (DONOGHUE *et al.*, 2000; TIPINIS *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2003). ALZAYADNEH *et al.* (2014) descreveram a alça ECA2/Ang 1-7/Mas como via alternativa dentro do SRA, que geralmente se opõe às ações da alça ECA/Ang II/AT1, diminuindo o estresse oxidativo, crescimento celular, inflamação e fibrose no tecido (CHAPPELL *et al.*, 2014). Além disso, essa via contra reguladora está envolvida na vasodilatação, anti-proliferação, anti-hipertrofia, com ações cardioprotetoras e renoprotetoras (NUNES-SILVA *et al.*, 2017),

De acordo com COUTINHO *et al.* (2014), o SRA (alça ECA/Ang II/AT1) está associado ao desenvolvimento do DM2 e com as alterações morfofuncionais no fígado. ZHANG *et al.* (2014) observaram que a Ang II induz dano tecidual hepático, incluindo, inflamação, fibrose e DHGNA. Pacientes com DHGNA apresentam hiperatividade da alça ECA/Ang II/AT1 (ZHANG *et al.*, 2013). A Ang II induz estresse oxidativo celular via receptor AT1 (HENRIKSEN *et al.*, 2013) e está envolvida no desenvolvimento de resistência à insulina (ZANG *et al.*, 2013). WU *et al.* (2016) mostraram que camundongos C57BL/6 tratados com doses supra-fisiológicas de Ang II aumentam a expressão gênica de

SREBP1c e o conteúdo de lipídio no fígado. ISHIZAKA *et al.* (2011) observaram que o aumento da Ang II está associado com a diminuição da expressão e da atividade da AMPK. Além disso, a Ang II tem papel pró-inflamatório e pró-fibrinogênio, já que faz parte da regulação de citocinas como a IL-6, a qual está relacionada com a inflamação do tecido hepático e consequente fibrose no fígado (SHAHID *et al.*, 2013; MORRIS *et al.*, 2013). Por fim, a ECA, que atua como reguladora chave do SRA também está diretamente associada ao desenvolvimento e progressão do DM2 e a DHGNA (SHAHID *et al.*, 2013).

A redução da alça ECA/Ang II/AT1 tem se mostrado eficaz para promover melhoras teciduais hepáticas que contemplam a sinalização intracelular da insulina (GOH *et al.*, 2014), maior controle do crescimento do tecido adiposo e de produção de citocinas pró-inflamatórias (GEORGESCU *et al.*, 2008). PACHOS *et al.* (2012) observaram que o bloqueio do receptor AT1 contribuiu para a prevenção da DHGNA, com efeitos anti-inflamatórios e anti-fibrinogênicos. Dessa forma, um dos possíveis mecanismos para a prevenção dos prejuízos morfofuncionais do fígado é o bloqueio farmacológico da alça ECA/Ang II/AT1 (CHEN *et al.*, 2008; GOH *et al.*, 2014).

Enquanto as investigações sobre a alça ECA/Ang II/AT1 acumulam grande conhecimento na literatura, a alça ECA2/Ang1-7/Mas ainda demanda mais estudos. Quando a alça ECA2/Ang1-7/Mas é ativada, observa-se efeito protetor contra inflamação e fibrose hepática (WEI *et al.*, 2008; SHENG *et al.*, 2011). A Ang 1-7 pode contrabalançar as ações prejudiciais da Ang II sobre o sistema de transporte de glicose dependente de insulina (HENRIKSEN *et al.*, 2013). De acordo com CAO *et al.* (2014), a Ang1-7 melhora a resistência à insulina no fígado via receptor Mas. Além disso, a Ang1-7 promove a melhora de alguns parâmetros associados à DHGNA como a hipertrigliceridemia, a lipogênese no fígado e, tem efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes (MARCUS *et al.*, 2013). Esses dados revelam o potencial da Ang 1-7 para o tratamento da DHGNA e os distúrbios metabólicos associados. A figura 2 resume as principais moléculas efetoras do SRA e suas ações no fígado.

Figura 2. Sistema renina angiotensina e metabolismo hepático.

2.3 TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO E PREVENÇÃO DE DOENÇAS METABÓLICAS

Está bem estabelecido na literatura que o TFA promove diversas adaptações metabólicas que favorecem diretamente a oxidação de lipídios como fonte de energia, contribuindo para a redução da adiposidade corporal (MOGHETTI *et al.*, 2016), possibilitando aos indivíduos treinados menor peso corporal quando comparados com indivíduos não treinados (HOWARD *et al.*, 2006). Além disso, sabe-se que o TFA reduz a glicemia de jejum e a incidência de DM2 (MALIN& KIRWAN, 2012).

Nos últimos anos, o nosso grupo de pesquisa tem estudado os efeitos do TFA responsáveis pela prevenção da obesidade e do DM2 em animais alimentados com dieta de cafeteria, tendo como alvo a investigação de mecanismos envolvidos na melhora da

habilidade do organismo para lidar com excesso de lipídios tipicamente observado nas doenças metabólicas. Observamos que o TFA é capaz de controlar o ganho de peso corporal em animais com dieta controle (HIGA *et al.*, 2012) e em animais com dieta de cafeteria (HIGA *et al.*, 2014). Demonstramos também que o TFA previne a resistência à insulina associada à obesidade através de adaptações no metabolismo do tecido adiposo branco, tais como melhora da atividade lipolítica, prevenção do aumento de enzimas lipogênicas e ativação de enzimas que favorecem a oxidação de lipídios ao invés do armazenamento. Revelamos ainda que, as adaptações ocorridas no tecido adiposo branco estão associadas com a maior ativação da proteína AMPK pelo TFA (HIGA *et al.*, 2014).

Alguns mecanismos induzidos pelo TFA podem participar ativamente da prevenção da DHGNA via melhora do metabolismo oxidativo. O TFA eleva os níveis de AMPK, proteína responsável por ativar vias que aumentam a síntese de ATP, disponibilizando mais ácido graxo e glicose para oxidação e diminuindo os estoques de lipídios no fígado (AL-JIFFRI *et al.*, 2013). A AMPK pode ser ativada quando existe aumento da relação AMP/ATP, servindo em síntese como sensor da necessidade de energia no organismo (HOU *et al.*, 2008; MOTTILLO *et al.*, 2017). A disfunção dessa proteína no fígado, induzida por hiperglicemia, pode ser chave para o acúmulo de lipídios no tecido hepático. CINTRA *et al.* (2012) observaram aumento na fosforilação da ACC (forma inativa) induzida pelo TFA em camundongos alimentados com dieta de cafeteria, a qual foi associada à melhora da oxidação de lipídios e menor acúmulo hepático. Esse mesmo estudo feito com ratos mostrou que a maior ativação da AMPK no fígado promoveu redução do acúmulo de lipídios, atenuando a hiperglicemia e promovendo a melhora da DHGNA. O estudo de LINDEN *et al.* (2014) com ratos mostrou que 15 minutos de TFA vigoroso ou 60 minutos de TFA moderado diariamente foi capaz de suprimir a atividade da ACC, aumentar a atividade da enzima citrato sintase e a oxidação de lipídios.

SALMINEN *et al.* (2011) observaram o efeito do TFA sobre o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1- α), um outro regulador energético transcricional importante, responsável pela biogênese mitocondrial. A AMPK é capaz de fosforilar a proteína PGC1- α , a qual é responsável por induzir a expressão da proteína anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10), cuja ação protetora contra o desenvolvimento da inflamação hepática é conhecida. O estudo de OLIVEIRA *et al.* (2014) mostrou que ratos

treinados por oito semanas aumentaram a quantidade da proteína sirtuína 1 (SIRT-1), PGC1- α e AMPK. Interessante observar no estudo de LAI *et al.* (2014), que ratos submetidos à natação por 12 semanas, durante cinco vezes por semana, tiveram os níveis protéicos de SIRT-1 aumentados, resultando em melhora na performance desses animais. A SIRT-1 faz parte da família das sirtuínas, as quais estão envolvidas em muitas funções fisiológicas e celulares, incluindo o metabolismo hepático de glicose e ácidos graxos, biogênese mitocondrial, gliconeogênese hepática, secreção de insulina e amadurecimento da célula adiposa. A superexpressão de SIRT-1 ativa o PGC1- α , que interage com o PPAR- α aumentando a oxidação lipídica e melhorando a DHGNA. Além disso, a SIRT-1 também está associada à inibição do SREBP1-c, diminuindo o conteúdo de lipídio hepático. Pacientes com obesidade e DHGNA possuem baixas concentrações de SIRT-1 (NASSIR *et al.*, 2016). Coletivamente, esses dados revelam que o TFA promove a ativação de proteínas que atuam diretamente no metabolismo oxidativo, e que podem estar envolvidas na melhora da oxidação de lipídios.

Em humanos, o TFA e a mudança no estilo de vida têm sido fortemente recomendados para a prevenção e tratamento de doenças como a DHGNA (DYSON *et al.*, 2014; SUNG *et al.*, 2016). No estudo randomizado de BACCHI *et al.* (2013), em pacientes com DM2, quatro semanas de TFA combinado com dieta hipocalórica foram capazes de reduzir a gordura hepática e as transaminases séricas. Outros estudos mostraram que o TFA diminui importantes proteínas pró-inflamatórias no sangue como a IL-6 (KAWAGUCHI *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2014; OLIVO *et al.*, 2014). KHAOSBATEN *et al.* (2013) observaram em noventa pacientes diagnosticados com DHGNA que, 12 semanas de TFA diminuíram a ALT e AST, e concluíram que o TFA regular foi capaz de ajudar na melhora da DHGNA. O estudo de AL-JIFFRI *et al.* (2013) mostrou que 15% na redução do índice de massa corporal (IMC) foi capaz de promover a melhora tecidual hepática, diminuir os níveis de ALT, resistência à insulina e a tolerância à glicose em pacientes com DM2 e DHGNA submetidos a três meses de TFA associado com restrição calórica na dieta.

Embora esteja claro na literatura o potencial terapêutico do TFA para as doenças metabólicas, a participação do SRA nessa resposta ainda foi pouco investigada, e os dados mais robustos foram obtidos apenas no coração e no músculo esquelético, mas

não no fígado. GU *et al.* (2014) observaram que 12 semanas de TFA foram capazes de reduzir os níveis de Ang II e dos receptores AT1 e AT2, e aumentar os níveis de Ang 1-7 no coração. Animais infartados apresentaram níveis elevados de Ang II, porém o TFA melhorou os níveis da expressão Ang 1-7 e a função cardíaca (GOMES-SANTOS *et al.*, 2014). O TFA atenua o aumento da Ang II e a inflamação no músculo esquelético de ratos idosos treinados (PARK *et al.*, 2012). Baseado nesses achados, parece que o TFA é capaz de prevenir e tratar doenças metabólicas por meio da modulação de ambas as alças do SRA. Nesse contexto, novos estudos se fazem necessários para avaliar se a modulação da alça ECA2/Ang 1-7/ Mas pelo TFA poderia ser um dos mecanismos de proteção contra o desenvolvimento de DHGNA induzida por dieta de cafeteria.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar se a prevenção da DHGNA por meio do TFA é mediada pela melhora do metabolismo hepático associada à ativação da alça do SRA ECA2/ Ang1-7/ Mas.

3.2 ESPECÍFICOS

Estudar em camundongos sedentários e treinados, submetidos à dieta controle e de cafeteria:

- O peso corporal e o consumo da ração;
- A deposição de lipídios e marcador de inflamação (IL-6) no fígado;
- Marcadores séricos de lesão hepática (enzimas AST e ALT);
- A atividade enzimática da ECA (fígado) e ECA2 (soro e fígado);
- A concentração de Ang 1-7 no fígado;
- A expressão dos genes SREBP1c, MTP, PPAR- γ , CPT1a e PPAR- α no fígado;
- A expressão protéica da AMPK, PGC1- α , SIRT-1, ACC e receptor Mas no fígado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Para o presente projeto de pesquisa foram utilizados 40 camundongos machos C57BL/6 com 8 semanas de vida (18-22g) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os camundongos foram separados aleatoriamente em 4 grupos experimentais, dependendo da dieta e da aplicação ou não do TFA: sedentário com dieta normocalórica (SED-NO, n=10), treinado com dieta normocalórica (TF-NO, n=10), sedentário com dieta de cafeteria (SED-CAF, n=10) e treinado com dieta de cafeteria (TF-CAF, n=10). Os animais foram mantidos em grupos de 4 ou 5 em cada caixa, em local com temperatura ambiente controlada entre 22- 24°C e ciclo claro-escuro invertido 12:12h, com início da fase escura as 7:00 e início da fase clara as 19:00. Água e comida foram administradas *ad libitum*.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL DO PROJETO

Antes do início do protocolo experimental (figura 3), todos os animais foram submetidos às análises *in vivo* (peso corporal, consumo de ração e teste de esforço físico máximo). Em seguida, o TFA e a administração da dieta de cafeteria foram iniciados simultaneamente. Na quarta semana do protocolo experimental, os grupos treinados (TF-NO e TF-CAF) foram submetidos novamente ao teste de esforço físico máximo para ajuste da intensidade do TFA. Ao longo do protocolo experimental, o consumo de ração e o peso corporal foram avaliados semanalmente. No final da oitava semana do protocolo experimental, todos os animais foram novamente submetidos ao teste de esforço físico máximo. Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício, das quais 8 horas finais em jejum, os animais foram submetidos ao procedimento de morte e posteriormente, as avaliações *in vitro* foram realizadas. 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, protocolo número 004/2015.

Figura 3. Desenho experimental do projeto.

4.3 DIETAS ALIMENTARES

A composição nutricional das dietas utilizadas no projeto de pesquisa está descrita na Tabela 1. A ração de 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. Um estudo prévio do nosso grupo observou que 8 semanas de consumo desta dieta de cafeteria resultou em aumento da adiposidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina em camundongos (HIGA *et al.*, 2014). Como ração controle, foi utilizada a industrializada padrão (Nuvilab®, Paraná, Brasil).

Tabela 1. Composição nutricional e valor energético das dietas (porção de 45g).

Dieta	Carboidrato	Proteínas	Gorduras Totais	Fibra Alimentar	Kcal/g
Normocalórica	55%	22%	4%	6%	3,78
Cafeteria	55,6%	14,77%	18,74%	3,24%	4,23

4.4 PROTOCOLO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO

O protocolo de TFA foi realizado em esteira rolante 5 vezes por semana, com duração de oito semanas. As sessões de treinamento tiveram intensidade de 60% da velocidade máxima, mensurada durante teste de esforço físico máximo. O TFA iniciou com 30 minutos de duração na primeira semana, e progressivamente foi aumentada, atingindo 60 minutos na quarta semana, conforme descrito por FERREIRA *et al.* (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 10 minutos. Esse procedimento foi necessário para evitar qualquer interferência do estresse gerado pela esteira. As dietas e o TFA foram iniciados simultaneamente (duração de 8 semanas).

4.5 TESTE DE ESFORÇO FÍSICO MÁXIMO

Na semana que antecedeu o primeiro teste de esforço físico máximo, os animais foram adaptados na esteira rolante com caminhada (0,2 – 0,4 Km/h) de 5 minutos por dia, durante 4 dias. Posteriormente, a capacidade de execução de exercício físico foi avaliada antes, na semana 4 e após o treinamento físico através de um teste progressivo escalonado em esteira rolante, sem inclinação até a exaustão (FERREIRA *et al.*, 2007). A velocidade inicial da esteira foi de 0,4 km/h, e a cada três minutos, a velocidade foi aumentada em 0,2 km/h até atingir a exaustão do animal, a qual foi caracterizada pela impossibilidade de manutenção do padrão da corrida. Na semana 4 foi realizado o teste somente nos grupos treinados (TF-NO e TF-CAF) para reajuste da intensidade do treinamento físico.

4.6 CONSUMO DE RAÇÃO

O consumo de ração foi avaliado em grupos de animais mantidos na mesma caixa (5 animais) ao longo de todo protocolo experimental, durante períodos de 24 horas, por 3 dias consecutivos de cada semana. Utilizamos a média dos 3 dias avaliados para determinar o consumo de ração diário em gramas/animal.

4.7 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Ao longo de todo protocolo experimental, o peso corporal de cada animal foi avaliado uma vez por semana em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil) para determinação do ganho de peso corporal semanal dos animais através da diferença entre o peso corporal final (semana 8) e o peso corporal inicial (semana 0).

4.8 PROCEDIMENTO DE MORTE E COLETAS

Os animais foram submetidos ao procedimento de morte quarenta e oito horas após a última sessão de TFA. Para isso, os animais permaneceram oito horas em jejum e em seguida foram anestesiados por injeção i.p. de Tiopental de Sódio (4mg / 100g de peso corporal). No momento em que o animal não demonstrou sinais de reflexo nas patas traseiras, foram pesados em balança digital. Em seguida, foi coletado o sangue através de punção na veia cava inferior, os depósitos gordura e o fígado, o qual foi armazenado em freezer -80°C para análises posteriores. O sangue foi centrifugado a 4°C, 12000 rpm, por 10 minutos, e posteriormente, o soro foi coletado e armazenado em freezer a -80°C.

4.9 DEPOSIÇÃO DE LIPÍDIOS

Para a preparação dos cortes, o fígado foi inicialmente (pós-eutanásia) colocado em isopentano, para manutenção da integridade estrutural e, em seguida, armazenado em -80 C. O tecido foi preso a um pedaço de cortiça com o auxílio de resina (TissueTek), e posteriormente, cortado em secções de 7 micrômetros de espessura no criostato. Em seguida, as secções do tecido foram colocadas em lâminas e fixadas em solução de formaldeído 3,7% durante 1 hora. Depois foram lavadas por três vezes durante 30 segundos. Após esse procedimento, as lâminas foram submersas no Oil Red O, por 30 minutos, e depois foram lavadas por três vezes durante 30 segundos. Para finalizar, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 60 segundos, seguida de lavagem por 10 minutos. As lâminas foram cobertas por lamínula com 10% de glicerol, para a análise no microscópio. Nessa técnica, os lipídios são corados com coloração laranja-vermelho (KOOPMAN *et al.*, 2001).

Para a análise, foi utilizado microscópio eletrônico marca Leica, modelo Leica DM 2500, no programa de quantificação Leica QWIN, com lente de aumento 40x. Foram avaliadas imagens do tecido dos animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, SED-NO (n=8), TF-NO (n=8), SED-CAF (n=8), TF-CAF (n=8). Para cada animal, foram quantificados 10 campos, sendo que o resultado apresentado foi obtido à partir da média dos campos. Os dados foram apresentados como % de lipídios por área.

4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para o estudo imunohistoquímico da IL-6, foi utilizado o método da estreptoavidina-biotina. As secções de 3,5µm de espessura do fígado foram colocadas em lâminas e passaram por um processo de desparafinização. Em seguida, foi feito a recuperação antigênica através da utilização de panela de pressão (Dako) com tampão citrato de sódio. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (10 volumes em temperatura ambiente). Consecutivamente, bloqueio de proteínas inespecíficas com protein block (Spring), por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a incubação do anticorpo primário anti- IL-6 (ABCAM, USA - 1:100) em solução protein block (Spring) 50% diluído em PBS em câmara úmida, por 18 horas, a 4 C. O anticorpo secundário utilizado foi o polímero universal anti-mouse e anti-rabbit (N-Histofine – Mouse Stain Kit) durante 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, os cortes foram revelados por solução cromógena de diaminobenzidina (Dab) (Sigma Chemical CO EUA) e contra-corados com hematoxilina. As lâminas foram montadas em Permount® (Fisher Scientific NJ EUA) e analisadas em microscópio eletrônico marca Leica, modelo Leica DM 2500, através do programa Image Pro Plus, com lente de aumento 40x. Foram avaliadas imagens do tecido dos animais selecionados aleatoriamente, SED-NO (n=8), TF-NO (n=8), SED-CAF (n=7), TF-CAF (n=8). Para cada animal, foram quantificados 20 campos, sendo que o resultado apresentado foi obtido à partir da média dos campos. Os dados foram apresentados como % de IL-6 por área.

4.11 DOSAGENS SÉRICAS AST e ALT

A concentração das enzimas marcadoras de lesão hepática aspartatoaminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram avaliadas

através de ensaio enzimático colorimétrico utilizando kits comerciais (Labtest, Brasil). Para estes ensaios, foram utilizados 200 µL dos reagentes do kit e 20 µL da amostra. Foram feitas duas leituras em espectrofotômetro (340nm), sendo a primeira após um minuto de incubação (absorbância 1) e, a segunda após dois minutos de incubação (absorbância 2). O cálculo da concentração da AST e ALT foi feito à partir da média das absorbâncias, conforme descrito na bula dos kits.

4.12. DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ECA E DA ECA2

A atividade da ECA foi avaliada no tecido hepático, e a atividade da ECA2 foi avaliada em soro e tecido hepático. Ambas as enzimas foram avaliadas através da utilização de peptídeos fluorescentes (ARAÚJO *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2010). Para a dosagem da ECA, as amostras foram incubadas com uma solução de Abz-FRK(Dnp)P-OH (Abz = ácido ortho-aminobenzóico; Dnp = dinitrophenil) (15µM) em 0,1 M de tampão Tris-HCl contendo 50 mM de NaCl e 10 mM ZnCl₂, pH 7,0. Como controle negativo, a hidrólise do Abz-FRK(Dnp)P-OH foi abolida por 0.5µM de captopril (ALVES *et al.*, 2005). Para a dosagem da ECA2, foi usado o peptídio Abz-APK(Dnp)-OH em 0.2 M de tampão Tris-HCl, 200 mM de NaCl, pH 7,5. Como controle negativo, foi utilizado DX600. As proteínas no tecido foram quantificadas pelo kit de ensaio protéico BCATM (PIERCE Biotechnology). A atividade foi expressa em UF.µg de proteína tecidual ou em UF.mL de soro.

4.13. QUANTIFICAÇÃO DA ANGIOTENSINA 1-7

Os níveis de Ang 1-7 foram avaliados no fígado por meio de ELISA, utilizando kit comercial (Biomatik, Wilmington, EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes. Foi pesado 100mg das amostras de fígado dos animais (armazenadas em -80 °C) e, após a extração de proteínas, foram realizados ciclos de congelamento e descongelamento visando o rompimento das membranas celulares. Após esse procedimento inicial, as amostras passaram por dois ciclos de centrifugação e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Em seguida, 100µl de amostra (diluição 1:1200) foi colocada na placa marcada com anticorpo primário, e incubada por 2h a 37 ° C. Posteriormente, foram realizadas

cinco incubações sequencias com diferentes reagentes e tempos de incubações. A leitura foi realizada com absorbância a 450nm. As proteínas foram quantificadas pelo método BCATM (PIERCE Biotechnology). Os resultados foram normalizados pelo conteúdo de proteínas e expressos em pg/ml/ μ g de proteína.

4.14 EXPRESSÃO GÊNICA

O RNA total foi extraído do fígado 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 foi maior que 1,8. A avaliação da expressão gênica foi realizada através de PCR em tempo real (RT-PCR), e os genes avaliados estão envolvidos no metabolismo de lipídios (SREBP1c, MTP- proteína microsomal de transferência de triglicerídeos, PPAR- γ) e na oxidação mitocondrial (CPT1, PPAR- α). Os *primers* para SREBP1c, MTP, PPAR- γ , CPT1a e PPAR- α foram concebidos para ter conteúdo de GC e temperaturas de recozimento semelhantes utilizando o programa *Primer* (ROZEN et al., 2000). As sequências dos *primers* para cada gene foram descritas na Tabela 2. As expressões de RNAm foram efetuadas no RG-3000 Rotor Gene (Corbett Research, Sydney, Austrália) utilizando Super ScriptTM III Platinum® One-Step quantitativa RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Alterações de fluorescência foram monitoradas após cada ciclo, e a análise de curva de fusão foi realizada no final de ciclos para verificar a identidade do produto de PCR (72°C, rampa de 99°C a 0,2°C / seg, com leituras de fluorescência contínuas). A especificidade de amplificações foi assegurada por eletroforese em gel de agarose para visualizar um fragmento único com o tamanho apropriado. Para avaliar a eficiência de amplificação de cada um dos genes alvos, a curva padrão foi construída a partir de uma amostra controle de RNA de fígado utilizando diluições em série em duplicata com cinco concentrações de RNA diferentes (500, 100, 20, 4, e 0,8 ng / mL). A quantificação relativa foi calculada utilizando o modelo matemático descrito por Pfaffl (2001). As amplificações de todos os genes foram realizadas em

duplicata de cada amostra. A expressão foi normalizada com níveis de b-actina ou GAPDH como referências endógenas.

Tabela 2. *Primers* para amplificação dos genes.

Gene	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
SREBP1c	GCG CTA CCG GTC TTC TAT CA	GGA TGT AGT CGA TGG CCT TG
MTP	CCT CTT GGC AGT GCT TTT TC	ATT TTG TAG CCC ACG CTG TC
PPAR- γ	CAT AAA GTC CTT CCC GCT GA	GAA ACT GGC ACC CTT GAA AA
PPAR- α	ATG CCA GTA CTG CCG TTT TC	TTG CCC AGA GAT TTG AGG TC
CPT1	TGC CTC TAT GTG GTG TCC AA	TCA AAC AGT TCC ACC TGC TG

4.15 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA

Para esse ensaio, 100 mg de cada amostra de tecido hepático, foi homogenizada em tampão de extração fosfato (50 MM KH₂PO₄; 50 MM K₂HPO₄), acrescido de inibidores de fosfatases (1:300, Sigma Aldrich) e inibidor total de proteases (1:300, Sigma Aldrich) e PMSF (1:1000). A cada 1 ml de tampão foi acrescentado 10 μ L de triton (10%), em seguida foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 4°C. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinar a concentração de proteína pelo kit de ensaio protéico BCA (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific, USA) e parte foi armazenada a -80°C para posteriores análises por *Western Blot*. Os anticorpos primários utilizados foram anti-AMPK α , anti-p-AMPK α (Thr172), anti-ACC e anti-p-ACC (Ser 79) anti-SIRT-1, anti-PGC1- α (Cell Signalling, USA, 1:1000 em solução de BSA 5%) e anti-Mas (ABCAM, USA - 1,25 :1000 em solução de BSA 5%). O anticorpo secundário utilizado foi de coelho, anti-rabbit marcado com HRP (Invitrogen, New York, USA - 1:2000 em solução de BSA 5%). Apenas para anti-SIRT-1 utilizamos o anticorpo secundário mouse (Invitrogen, New York, USA -

1:2000 em solução de BSA 5%). Além disso, utilizamos como normalizador o anticorpo para β -actina (ABCAM, USA - 1:2000 em solução de BSA a 5%). O sinal de membrana foi detectado através de reação da peroxidase na solução de ECL durante exposição no equipamento Image Quant LAS 4000 mini (GE HealthcareLifescience®). A intensidade de banda foi quantificada no programa Image J (versão 1.43 para Windows).

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média e, comparados através de análise de variância de dois fatores (ANOVA). Na presença de diferenças estatísticas significantes, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Em todas as análises foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism, versão 6.

5 RESULTADOS

5.1 CAPACIDADE FÍSICA

Não houve diferença na velocidade máxima atingida no teste de esforço físico realizado antes do início do protocolo experimental entre os grupos (figura 4). Já no teste de esforço físico realizado no final da oitava semana de protocolo experimental, os grupos TF-NO e TF-CAF atingiram maior velocidade máxima comparada aos grupos SED-NO e SED-CAF, confirmando que o TFA aumentou a capacidade física dos animais treinados (figura 5). Esse resultado sinaliza que o TFA foi eficaz para promover adaptação tipicamente aeróbia.

Figura 4. Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico realizado pré-treinamento físico aeróbico (n=5/grupo).

Figura 5: Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico pós-treinamento físico. *p≤ 0,05 vs. SED-NO, # p≤0,05 vs. SED-CAF (n=5/grupo).

5.2 COMPOSIÇÃO CORPORAL

Não houve diferença estatística no peso corporal inicial entre os grupos (figura 6). No entanto, pode-se observar que nas semanas 4 e 7, ambos os grupos treinados TF-NO e TF-CAF apresentaram peso corporal menor que o grupo SED-NO e SED-CAF. Nas semanas 4, 5 e 7 o grupo TF-NO apresentou menor peso corporal apenas comparado ao grupo SED-NO. Na semana 6, o grupo TF-NO apresentou peso corporal menor que

ambos os grupos SED-NO e SED-CAF. Já na semana 8, o grupo TF-NO apresentou peso corporal menor comparado ao grupo SED-CAF (figura 6).

Figura 6: Evolução do peso corporal semanal. * $p \leq 0,05$ TF-NO e TF-CAF vs. SED-NO e SED-CAF; # $p \leq 0,05$ TF-NO vs. TF-CAF; \$ $p \leq 0,05$ TF-NO vs. SED-NO e SED-CAF; & $p \leq 0,05$ TF-NO vs. SED-CAF (n=10/grupo).

Quando avaliamos a ganho de peso corporal, ou seja, a diferença entre o peso corporal final e o peso corporal inicial, observamos que o grupo TF-NO apresentou menor ganho de peso corporal comparado aos grupos SED-NO e SED-CAF, e o grupo TF-CAF apresentou menor ganho de peso corporal comparado ao grupo SED-CAF (figura 7).

Figura 7: Ganho de peso corporal durante 8 semanas. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO e SED-CAF; # $p \leq 0,05$ vs. SED-CAF (n=10/grupo).

Conforme demonstrado na figura 8 os grupos TF-NO e TF-CAF apresentaram menores pesos dos depósitos de gordura subcutâneo (TAB-SC), periepididimal (TAB-PE) e retroperitoneal (TAB-RP) em relação ao grupo SED-CAF.

Figura 8: Peso dos depósitos gordura subcutâneo (TAB-SC), periepididimal (TAB-PE) e retroperitoneal (TAB-RP) em valores absolutos. * $p \leq 0,05$ vs. TF-NO e TF-CAF (n=5/grupo).

Na avaliação do peso do fígado, os grupos SED-CAF e TF-CAF apresentaram menor peso do fígado comparado ao grupo TF-NO (figura 9).

Figura 9: Peso do fígado. * $p \leq 0,05$ vs. TF-NO (n=10/grupo).

5.3 CONSUMO DE RAÇÃO

Conforme demonstrado nas figuras 10A e 10B, a média do consumo alimentar tanto em gramas quanto em quilocalorias foi maior nos grupos SED-CAF e TF-CAF comparado aos grupos SED-NO e TF-NO. A figura 10C representa o consumo alimentar por semana.

Figura 10. Média do consumo alimentar diário em gramas (A), em quilocalorias (B) e (C) consumo alimentar semanal, durante o protocolo experimental (n=10/grupo), *p≤ 0,05 vs. SED-NO e TF-NO.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL HEPÁTICA

5.4.1 Deposição de lipídio

Conforme pode ser observado na figura 11, ambos os grupos TF-NO e TF-CAF apresentaram menor deposição lipídica comparada ao grupo SED-CAF (figura 11). A figura 12 ilustra fotomicrografias representativas dos cortes histológicos utilizados para a análise.

Figura 11. Conteúdo de lipídio hepático (n= 8 animais/grupo) * $p \leq 0,05$ vs. SED-CAF.

Figura 12. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos hepáticos corados com Oil Red O para a visualização de deposição lipídica no aumento 40x.

5.4.2 Conteúdo hepático de IL-6

Conforme pode ser observado na figura 13, o conteúdo da proteína pró-inflamatória IL-6 foi menor apenas no grupo TF-CAF comparado ao grupo SED-CAF (figura 13). A figura 14 ilustra fotomicrografias representativas dos cortes histológicos utilizados para a análise.

Figura 13. Conteúdo de IL-6 hepático (n=7-8 animais/grupo) * $p \leq 0,05$ vs. SED-CAF.

Figura 14. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos hepáticos. Visualização da concentração de IL-6 no aumento 40x.

5.4.3 Dosagens séricas AST e ALT

Como pode ser observado na figura 15, não houve diferença estatística na concentração de AST sérica entre os grupos estudados. O mesmo pode-se observar na figura 16, pois não houve diferença estatística entre os grupos na análise da ALT sérica.

Figura 15. Concentração sérica de AST dos animais após protocolo experimental (n=6-7).

Figura 16. Concentração sérica de ALT dos animais após protocolo experimental (n=6-9).

5.5 EXPRESSÃO GÊNICA

Conforme os dados apresentados na tabela 3, o estudo da expressão gênica não mostrou diferença estatística na análise dos genes CPT1, MTP, PPAR- α , PPAR- γ e SREBP1c. Embora não tenha sido estatisticamente diferente, o grupo SED-CAF

apresentou valores elevados da expressão do gene MTP quando comparado ao grupo TF-CAF.

Tabela 3. Expressão de RNAm no fígado (n=5/grupo).

	SED-NO	TF-NO	SED-CAF	TF-CAF
CPT1	1,24 ± 0,04	1,17 ± 0,02	1,27 ± 0,03	1,2 ± 0,04
MTP	3,49 ± 0,86	3,23 ± 0,96	4,60 ± 0,45	2,29 ± 0,41
PPAR - α	0,59 ± 0,04	0,6 ± 0,05	0,55 ± 0,06	0,54 ± 0,05
PPAR - γ	0,93 ± 0,04	0,88 ± 0,02	0,86 ± 0,04	0,87 ± 0,04
SREBP1c	0,86 ± 0,01	0,83 ± 0,006	0,89 ± 0,01	1,2 ± 0,08

5.6 EXPRESSÃO PROTÉICA

Não observamos diferença estatística na expressão protéica da AMPK total (figura 17A), da p-AMPK (Thr172) (figura 17B) e na razão p-AMPK/t-AMPK (figura 17C) entre os grupos estudados.

A. **B.** **C.**

Figura 17. Expressão proteica da AMPK total (A), fosforilada (B) e razão p-AMPK/t-AMPK (C) (n=8/grupo).

Na figura 18, pode-se observar que não houve diferença na expressão proteica da PGC1- α no fígado. De forma semelhante, não observamos diferença na expressão protéica da SIRT- 1 entre os grupos estudados (figura 19).

Figura 18. Expressão proteica da PGC1- α (n=8/grupo).

Figura 19. Expressão proteica da SIRT-1 (n=7/grupo).

Não foram observadas diferenças na expressão das proteínas ACC total (figura 20A), p-ACC (Ser 79) (figura 20B), bem como da razão p-ACC/t-ACC (figura 20C) no fígado dos grupos estudados.

Figura 20. Expressão proteica da ACC total (A), fosforilada (B) e razão p-ACC/t-CC (C) (n=5/grupo).

5.7 COMPONENTES DO SRA

A atividade enzimática da ECA 2 no soro, dos grupos TF-NO e TF-CAF foi superior comparada aos grupos SED-NO e SED-CAF (figura 21).

Figura 21. Atividade da enzima ECA2 no soro (n=10/grupo). *p≤ 0,05 vs. SED-NO e #p≤ 0,05 vs. SED-CAF.

Não observamos diferença estatística na atividade da enzima ECA2 no fígado dos grupos estudados (figura 22). Entretanto, o grupo TF-NO apresentou menor atividade da enzima ECA no fígado comparado ao grupo TF-CAF (figura 23).

Figura 22. Atividade da enzima ECA2 no fígado (n=10).

Figura 23. Atividade da enzima ECA no fígado (n=7-9) *p<0,05 vs. TF-CAF.

Tanto a concentração de Ang1-7 (figura 24) quanto a expressão proteica do receptor Mas (figura 25) avaliadas no fígado não foram diferentes entre os grupos estudados.

Figura 24. Concentração de Ang 1-7 no fígado (n=10/grupo).

Figura 25: Expressão proteica do receptor Mas (n=5-6/grupo).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo propôs avaliar os efeitos da dieta de cafeteria sobre a função e a morfologia hepática, além do potencial do TFA para a prevenção de possíveis danos hepáticos causados pela ingestão crônica de dieta de cafeteria. Além disso, propomos investigar a participação da alça ECA2/Ang 1-7/Mas do SRA nessas respostas. Para isso, os animais foram separados em quatro grupos experimentais, dependendo da dieta (normocalórica vs. cafeteria) e da aplicação ou não do TFA.

O modelo experimental de obesidade e resistência à insulina induzido por dieta de cafeteria foi escolhido para o presente trabalho por induzir alterações metabólicas importantes em tecidos metabolicamente ativos, como o tecido adiposo branco, o músculo esquelético e o fígado. Em estudo prévio com o mesmo modelo experimental utilizado aqui, demonstramos que a dieta de cafeteria induziu hiperinsulinemia, resistência à insulina, alterações no balanço da lipólise e lipogênese do tecido adiposo branco, aumento de ácidos graxos livres, aumento da adiposidade, hiperleptinemia e diminuição dos níveis séricos de adiponectina (HIGA *et al.* 2014). Em função de tais respostas e dos diversos estudos na literatura que relacionaram o aumento da adiposidade corporal com alterações no metabolismo de glicose e desenvolvimento da DHGNA (GENTILE *et al.*,

2015; WIDER, 2016; BROUWERS *et al.*, 2017; GEISLER *et al.*, 2017), escolhemos o mesmo modelo para investigar o efeito do TFA sobre a estrutura e a função hepática.

No presente estudo, podemos observar que os animais responderam adequadamente ao TFA, uma vez que ambos os grupos treinados apresentaram melhor desempenho no teste de esforço físico máximo na 8ª semana de TFA em comparação aos grupos sedentários. Essa resposta confirma a eficácia do TFA para a promoção de adaptações aeróbias, que normalmente estão associadas com a melhora da saúde cardiovascular e metabólica.

O TFA tem sido amplamente utilizado como ferramenta importante para o controle de peso corporal, adiposidade e tratamento não farmacológico da obesidade (BIRD *et al.*, 2017; BOUDIA *et al.*, 2017). No presente estudo, a avaliação de peso corporal ao longo do tempo demonstrou que ambos os grupos treinados apresentam menor peso corporal comparado aos grupos SED-NO e SED-CAF nas 4ª e 7ª semanas de TFA. No término do protocolo de TFA (8ª semana) apenas o grupo TF-NO apresentou menor peso corporal comparado ao SED-CAF. Quando avaliamos o ganho de peso corporal, observamos que o grupo TF-NO apresentou menor ganho de peso corporal (14%) comparado ao grupo SED-NO (25%) e SED-CAF (28%). Interessante observar que os animais do grupo TF-CAF apresentaram menor ganho de peso corporal (19,6%) comparado ao grupo SED-CAF. Em estudo prévio do nosso grupo (HIGA *et al.*, 2014), demonstramos que além do benefício para o controle de peso corporal, o TFA também foi capaz de prevenir o aumento da adiposidade corporal. Esse dado foi reproduzido no presente estudo, pois o TFA também preveniu o aumento de adiposidade nos animais TF-CAF e TF-NO. Isso porque o peso dos depósitos de gordura subcutâneo, periepididimal e retroperitoneal dos grupos TF-NO e TF-CAF foram menores comparados ao grupo SED-CAF. Quanto à avaliação do peso do fígado, foi observada diferença estatística nos grupos TF-CAF e SED-CAF que tiveram menor peso do fígado comparado ao grupo TF-NO. Esse dado apresentado corrobora o estudo de LEPORE *et al.*, (2015), no qual os animais alimentados com dieta de cafeteria tiveram o peso do fígado reduzido. Enquanto o dado de peso de fígado do grupo SED-CAF pode ser justificado pelo aumento da deposição lipídica, o mesmo não pode ser feito para o grupo TF-CAF, já que o TFA preveniu o aumento da deposição lipídica nesse grupo.

No presente estudo, observamos que o consumo alimentar foi menor nos grupos SED-NO e TF-NO comparados aos grupos SED-CAF e TF-CAF, tanto em gramas quanto em calorias. Em estudo prévio de padronização do modelo experimental (Higa *et al.*, 2014), já havíamos demonstrado que a dieta de cafeteria causava hiperfagia nos animais. No entanto, nenhuma diferença estatística foi observada no estudo subsequente tanto nos animais sedentários quanto nos treinados que consumiram a mesma dieta de cafeteria (Higa *et al.*, 2014). Na literatura, os dados também são contraditórios. EGUCHI *et al.* (2008) ao administrar dietas de cafeteria e controle, não encontraram diferença no consumo alimentar dos grupos treinados com natação. Já GOLLISCH *et al.* (2009) demonstraram aumento no consumo alimentar de animais treinados, independente da dieta (normocalórica ou hiperlipídica). Em conjunto, as respostas de consumo alimentar associadas com o TFA não seguem padrão único, e podem ser explicadas por diferentes fatores, tais como tipos de dietas, tipo de treinamento físico, cepa dos animais, condições do biotério, entre outros.

O TFA propicia benefícios para a saúde e prevenção das doenças crônicas na população (TAN *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2017). Estima-se que 25% da população adulta no mundo são afetados pela DHGNA (YANBIAO AI *et al.*, 2017). Como já descrito, a característica principal desse distúrbio metabólico é o acúmulo de lipídios no tecido hepático, fato que corrobora a análise de deposição lipídica no grupo SED-CAF. Interessante observar que o TFA promoveu a redução de lipídios no fígado, independente do tipo de dieta (normocalórica ou cafeteria). Na mesma direção, YASARI *et al.* (2012) relataram que o TFA diminuiu o acúmulo de lipídios no fígado induzido por dieta tanto em animais quanto em humanos. A dupla recomendação de TFA e restrição calórica tem sido proposta por diversos estudos na literatura para a prevenção da DHGNA, redução do tecido adiposo visceral, aumento da oxidação lipídica, diminuição dos níveis de triglicerídeos e LDL colesterol sanguíneos e melhora dos níveis de HDL colesterol (MARQUES *et al.*, 2010; VOLYNETS *et al.*, 2012). Esses achados indicam que o TFA pode ser uma ferramenta importante para prevenir o acúmulo de lipídios e o desenvolvimento da DHGNA.

O acúmulo de lipídios pode levar ao desenvolvimento de quadro inflamatório e danos na função hepática. Nesse estudo, escolhemos avaliar a citocina IL-6 como marcadora de inflamação, e a AST e ALT como marcadoras de função hepática. Quando

analisamos a IL-6 no fígado, o grupo TF-CAF apresentou menor quantidade comparado ao grupo SED-CAF. Esse dado corrobora o estudo randomizado de LI *et al.* (2017), no qual foi demonstrado que animais alimentados com dieta rica em gordura, porém submetidos ao TFA, apresentaram níveis de IL-6 menores comparados aos animais sedentários alimentados com a mesma dieta. KOMINE *et al.* (2017) observaram que o aumento na concentração de IL-6 em ratos sedentários era maior comparado ao grupo que realizou TFA, e que essa resposta pró-inflamatória estava associada com a progressão da DHGNA. Em humanos com progressão da DHGNA, o TFA também foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 (ABD EL KADER *et al.*, 2016). Esses dados confirmam a importância do TFA para a prevenção da inflamação e, consequentemente, para melhorar o prognóstico da doença.

Apesar de a dieta de cafeteria provocar aumento importante na deposição de lipídio nos animais SED-CAF, não observamos qualquer repercussão nas concentrações das enzimas marcadoras de função hepática AST e ALT. Uma das possíveis justificativas para esses resultados foi o tempo de protocolo experimental utilizado no presente estudo, que possivelmente não foi suficiente para gerar danos hepáticos que levam ao aumento da concentração de ambas as enzimas. Além disso, de acordo com a literatura, nem sempre as concentrações das enzimas ALT e AST são modificadas pela dieta e pela condição metabólica do indivíduo. BRAVO *et al.* (2012) demonstraram que ratos alimentados com alto teor de gordura apresentaram aumento da ALT, enquanto a AST permaneceu inalterada. No estudo de coorte com 97 adultos obesos, GHOLAM *et al.*, (2017) observaram que 46% dos indivíduos com EHNA apresentaram transaminases normais. Descreveram ainda que, os pacientes com EHNA apresentaram resistência à insulina mais severa comparada com os indivíduos com DHGNA, e essas enzimas se apresentam de maneira mais acentuada na progressão da doença EHNA, porém não encontraram alterações nesses marcadores. Como a dieta não provocou qualquer alteração na concentração das enzimas no nosso estudo, o TFA também não teve efeito. Esse resultado era esperado, já que o suposto efeito do TFA seria de prevenção do aumento das enzimas AST e ALT. De fato, GHAREGHANI *et al.* (2017) demonstraram que 10 semanas de TFA foram capazes de diminuir as concentrações de ALT e AST em camundongos alimentados com dieta de cafeteria. Além disso, estudos anteriores observaram com sucesso o efeito do TFA para a redução da concentração sérica dessas

enzimas em pacientes com DHGNA, comparado ao grupo controle (ABD EL-KADERET *et al.*, 2016; KATSAGONI *et al.*, 2017).

Na tentativa de entender os mecanismos pelos quais o acúmulo de lipídios no fígado acontece no nosso modelo experimental, e como o TFA é capaz de influenciar esse processo, partimos para o estudo de genes e proteínas-chaves que controlam o metabolismo de lipídios no tecido hepático. Foram avaliadas a expressão dos genes PPAR- α e CPT1, os quais são responsáveis pela oxidação de ácidos graxos, o gene do SREBP1c, que é responsável pela ativação e indução de genes lipogênicos como a FAS e ACC e o gene da MTP que assim como FAS e SREBP1c, está associada com a lipogênese no fígado. A MTP é essencial para a formação da gotícula lipídica à partir de triglicerídeos e colesterol (LOVE *et al.*, 2015), além de estar envolvida na secreção de ceramidas e esfingomielinas, e na transferência desses lipídios do plasma para o fígado e intestino (IQBAL *et al.*, 2015). Avaliamos também, o gene PPAR - γ que desempenha papel importante na regulação da lipogênese no fígado e está associado ao desenvolvimento da DHGNA (OHN *et al.*, 2017). Os resultados revelaram que não houve diferença estatística na expressão dos genes, no entanto, embora não tenha tido diferença estatística na expressão da MTP, o grupo SED-CAF apresenta valores elevados comparado ao grupo TF-CAF, o que pode estar relacionado com o acúmulo de lipídios no tecido hepático desses animais e com a prevenção do TFA no grupo TF-CAF. Esse dado corrobora o estudo prévio de ZHAN *et al.* (2015), onde animais com DHGNA apresentam valores significativamente maiores do RNAm da MTP comparado a seus controles. ZHAO *et al.*, (2014), em um estudo *in vitro* com indução de DHGNA em hepatócitos, observaram o mesmo aumento.

Quanto às avaliações protéicas, investigamos uma das vias que exerce maior controle do metabolismo oxidativo e que havíamos demonstrado anteriormente ser acionada pelo TFA no tecido adiposo branco do mesmo modelo experimental do presente estudo (HIGA *et al.*, 2014). Curiosamente, não encontramos diferenças estatísticas na expressão das proteínas AMPK, SIRT-1, PGC1- α e ACC. Outros trabalhos na literatura demonstraram a importância da ativação de proteínas como AMPK, SIRT-1 e PGC1- α para a prevenção de distúrbios metabólicos e doenças hepáticas associadas ao excesso de lipídios (HE *et al.* 2016; YANG *et al.* 2014; ROMAM *et al.* 2010). A ativação de tais proteínas pode aumentar a oxidação de lipídios e, portanto, impedir o acúmulo dos

mesmos. ROCHA *et al.* (2015) demonstraram que a ativação da AMPK no fígado induzida pelo consumo de chá-verde modula a expressão de genes envolvidos no metabolismo, e por isso poderia ser uma estratégia terapêutica para combater a resistência à insulina, dislipidemia e obesidade em ratos. OFIR *et al.* (2007), MARCINKO *et al.* (2014), MOTTILLO *et al.* (2017) e TAN *et al.* (2017) mostraram que durante o exercício físico, a ativação da AMPK fosforila proteínas alvos, tais como ACC fosforilada (inativa), que por sua vez, diminui a ação inibitória da malonil-coa sobre a CPT-1, uma importante proteína transportadora de ácidos graxos na mitocôndria (RIBEIRO-OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Com o conjunto de dados de expressão gênica e protéica, é possível sugerir que a deposição lipídica hepática induzida pela dieta de cafeteria e prevenida pelo TFA não foi decorrente de mecanismos envolvidos na atividade oxidativa no fígado. É importante considerar que o direcionamento deste estudo foi feito para a investigação de mecanismos oxidativos, no entanto, novos estudos são necessários para investigar se a atividade lipogênica exerce maior protagonismo nessa história.

Considerando que o balanço entre síntese e oxidação é determinante do conteúdo de lipídios nos diferentes tipos de tecido, e que o TFA tem o potencial de acionar a oxidação via aumento da AMPK no tecido adiposo branco e no músculo esquelético (PADUA *et al.*, 2009; RONDINI *et al.*, 2017), buscamos peptídeos que poderiam mediar o efeito do TFA sobre as proteínas envolvidas no metabolismo oxidativo, e consequentemente, na prevenção da DHGNA. Baseado neste contexto e nos achados da literatura, apostamos que a Ang 1-7 seria o peptídeo mediador da ação do TFA para a prevenção da DHGNA. Assim, a última etapa foi destinada para a investigação da alça ECA2/ Ang 1-7/ receptor Mas do SRA.

No nosso estudo, o TFA induziu aumento na atividade da enzima ECA 2 apenas no soro dos grupos TF-NO e TF-CAF, enquanto no fígado, não foi diferente entre os grupos. Considerando que a enzima ECA é responsável por converter a Ang I em Ang II, e que a Ang 1-7 pode ser gerada a partir de Ang II, decidimos avaliar também a atividade da enzima ECA no fígado. Como demonstrado nos resultados, a atividade da ECA no fígado foi menor no grupo TF-NO comparado ao grupo TF-CAF. Essa redução na atividade da ECA poderia estar associada com a menor formação de Ang II, no entanto, isso não é possível afirmar no nosso estudo porque além de não termos avaliado a

concentração de Ang II, não investigamos a atividade da renina, a concentração de Ang I e tampouco vias alternativas de formação de Ang II independente da ECA, como por exemplo, as quimases. De qualquer forma, uma redução da ECA promovida pelo TFA pode favorecer a melhora metabólica do tecido hepático (FRANTZ *et al.*, 2017), no entanto, não foi observada diferença na atividade dessa enzima no grupo TF-CAF.

O aumento da atividade da enzima ECA 2 no soro não repercutiu em mudanças na concentração de Ang 1-7 no fígado, pois não houve diferença desse peptídeo entre os grupos estudados. De forma semelhante, não foram encontradas diferenças na expressão protéica do receptor Mas no fígado. Apesar de a literatura ter demonstrado a associação da ativação da alça ECA2/Ang1-7/Mas com a melhora de alguns processos fisiopatológicos em doenças inflamatórias, como a diminuição da inflamação, resistência à insulina e fibrose (FRANTZ *et al.*, 2017), e de que o TFA pode ativar essa alça e promover efeitos positivos de vasodilatação e ação antiinflamatória em ratos (NUNES-SILVA *et al.*, 2017), nossos resultados demonstram que os benefícios gerados pelo TFA não foram associados com a ativação alça do SRA ECA 2/Ang 1-7/Mas no fígado. Interessante observar que o efeito terapêutico do TFA foi mediado pelo acionamento dessa alça no coração e no músculo esquelético (FERNANDES *et al.*, 2011; GOMES-SANTOS *et al.*, 2014). Esses achados reforçam ainda mais a complexidade do SRA e a diversidade de ações que podem ser específicas para cada tecido.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o conjunto de dados obtido no presente estudo permite afirmar que o TFA preveniu a DHGNA evidenciado pelo menor conteúdo de lipídios e citocina pró-inflamatória IL-6, no entanto, essa resposta foi independente de mudanças na expressão de genes e de proteínas reguladoras do metabolismo hepático associada à alça do SRA ECA2/ Ang1-7/ Mas.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-KADER, S. M.; AL-SHREEF, F. M.; AL-JIFFRI, O. H. Biochemical parameters response to weight loss in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Afr Health Sci.** King Abdulaziz, v. 1, n. 16, p. 242- 9, 2016.
- AHN, S. B.; JANG, K.; JUN, D. W.; LEE, B. H.; SHIN, K. J. Expression of Liver X Receptor Correlates with Intrahepatic Inflammation and Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Dig Dis Sci. Seoul**, v.129, n.5, p. 2975-82, 2014.
- AKINKUGBE, A. A.; SLADE, G. D.; SIDNEY, B. A.; OFFENBACHER, S. PETERSMANN, A.; KOCHER, T.; LERCH, M. M.; MAYERLE, J.; VOLZKE, H.; HEISS, G.; HOLTFRETER, B. Periodontitis and Non-alcoholic Fatty Liver Disease, a population based cohort investigation in the Study of Health in Pomerania. **J Clin Periodontol.** Chapel Hill, 2017.
- AL-JIFFRI, O.; ALSHARIF, F. M.; EL-KADER, S. M.; ASHMAWY, E. M.; Weight reduction improves markers of hepatic function and insulin resistance in type-2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver. **African Health Sciences.** King Abdulaziz, v. 13, n. 3, p. 667-672, 2013.
- ALZAYADNEH, E. M.; CHAPPELL, M. C. Angiotensin-(1-7) abolishes AGE-induced cellular hypertrophy and myofibroblast transformation via inhibition of ERK1/2. **Cell Signal.** Winston-Salem, v. 14, n.12, p.3027-35, 2014.
- BACCHI, E.; MOGHETTI, P.; Exercise for Hepatic Fat Accumulation in Type 2 Diabetic Subjects. **International Journal of Endocrinology.** Verona, p. 5, Article ID 309191, 2013.
- BHAT, G.; BABA, C. S.; PANDEY, A.; KUMARI, N.; CHOUDHURI, G.; Life style modification improves insulin resistance and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Hepatology.** Manipal, v. 7, n. 4, p. 209-217, 2012.
- BIRD, S. R.; HAWLEY, J. A. Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. **BMJ Open Sport Exerc Med.** Victoria, v. 1, n. 2, 2017.
- BOUCHER, M. P.; LEFEBVRE, C.; CHAPADOS, N. A. The effects of PCB126 on intra-hepatic mechanisms associated with non alcoholic fatty liver disease. **J Diabetes Metab Disord.** Ottawa, p. 14-88, 2015.

BOUDIA, D.; DOMERGUE, V.; MATEO, P.; FAZAL, L.; PRUD'HOMME, M.; PRIGENT, H.; DELCAYRE, C.; COHEN-SOLAL, A.; GARNIER, A.; VENTURA-CLAPIER, R.; SAMUEL, J. L. Beneficial effects of exercise training in heart failure are lost in male diabetic rats. **J Appl Physiol.** Inserm, 2017.

BOTEZELLI, J.D.; MORA, R. F.; DALLA, R. A.; MOURA, L. P.; CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C.; VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R.; Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed on fructose-rich diet. **Lipids in Health and Disease.** São Paulo, v. 9, p. 116, 2010.

BRAVO, E.; PALLESCHI, S.; ROSSI, B.; NAPOLITANO, M.; TIANO, L.; D'AMORE, E.; BOTHAM, K. M. Coenzyme Q Metabolism Is Disturbed in High Fat Diet-Induced Non Alcoholic Fatty Liver Disease in Rats. **Int J Mol Sci.** Rome, v. 2, n. 13, p.1644-57, 2012.

BROUWERS, B.; SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B.; JELENIK, T.; GEMMINK, A.; HAVEKES, B.; BRULS, Y.; DAHLMANS, D.; RODEN, M.; HESSELINK, M. K. C.; SCHRAUWEN, P. Metabolic disturbances of non-alcoholic fatty liver resemble the alterations typical for type 2 diabetes. **Clin. Sci.** Maastricht, v. 15, n. 131, p. 1905-1917, 2017.

CAO, X., YANG, F., SHI, T., YUAN, M., XIN, Z., XIE, R., LI, S., LI, H., YANG, J. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1–7)/Mas axis activates Akt signaling to ameliorate hepatic steatosis. **Sci Rep.** BeijinG, v. 6, n. 21592, 2016.

CAO, X.; YANG, F.; XIN, Z.; XIE, R.; YANG, J.; The ACE2/Ang-(1-7)Mas axis can inhibit hepatic insulin resistance. **Molecular and Cellular Endocrinology Molecular.** Beijing, v.393, n. 5, p.30-8, 2014.

CARON, A. Z.; HE, X.; MOTTAWEA, W.; SEIFERT, E. L.; JARDINE, K.; DEWAR-DARCH, D, CRON, G. O.; HARPER, M. E.;, STINTZI, A, MCBURNEY, M. W. The SIRT1 deacetylase protects mice against the symptoms of metabolic syndrome. **Faseb J.** Ottawa, v. 28, n. 39, 1306-16, 2014.

CHAPPELL, M. C., MARSHALL, A. C., ALZAYADNEH, E. M., SHALTOUT, H. A., DIZ, D. I. Update on the Angiotensin Converting Enzyme 2-Angiotensin (1–7)-Mas Receptor Axis: Fetal Programing, Sex Differences, and Intracellular Pathways. **Front Endocrinol.** Puerto Rico, v. 4, p. 201, 2014.

- CHEN, Y. H.; YUAN, L.; CHEN, Y. Y.; QI, C. J. The effects of renin-angiotensin system blockade on the liver steatosis in rats on long-term high-fat diet. **Zhonghua Nei KeZaZhi**. Tongji, v. 47, n. 3, p. 197-201, 2008.
- CHOOI, K. F., KUPPAN RAJENDRAN, D. B., PHANG, S. S., TOH, H. H. The Dimethylnitrosamine Induced Liver Fibrosis Model in the Rat. **J Vis Exp**. Temasek, v.112, n.17, 2016.
- CHOU, C. L.; LIN, H.; CHEN, J. S.; Te-Chao FANG, T. C. Renin inhibition improves metabolic syndrome, and reduces angiotensin II levels and oxidative stress in visceral fat tissues in fructose-fed rats. **PloS One**. Taipei, v.7, n. 12, 2017.
- CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; VITTO, M. F.; LUCIANO, T. F.; SOUZA, D. R.; ENGELMANN, J.; MARQUES, S. O.; LIRA, F. S.; PINHO, R. A.; PAULI, J. R.; SOUZA. C. T.; Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: The role of sterol regulatory element-binding protein-1c. **Life Sciences**. Campinas, v. 10, p. 1016, 2012.
- COUTINHO, D. C.; MONNERAT-CAHLI, G.; FERREIRA, A. J.; MEDEI, E. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 improves cardiac electrical changes in ventricular repolarization in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats. **Europace**. Belo Horizonte, v.11, n.16, p.1689-96, 2014.
- DONOGHUE, M.; HSIEH, F.; BARONAS, E.; GODBOUT, K.; GOSSELIN, M.; STAGLIANO, N.; DONOVAN, M.; WOOLF, B.; ROBISON, K.; JEYASEELAN, R.; BREITBART, R. E.; ACTON S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. **Circ Res**. Massachusetts, v.5, n. 87, p. E1–E9, 2000.
- DYSON, J.; DAY, C.; Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **DigestiveDiseases**. Newcastle, v 32, p 597-604, 2014.
- EBERTZ, C. E.; BONFLEUR, M. L.; BERTAZZO, L. I.; CARLA MENDES, M.; LUBACZEUSKI C.; ARAUJO, A. C. F.; PAES, A. M.; AMORIM, E. M. P.; BALBO, S. L.; Duodenal jejunal bypass attenuates non-alcoholic fatty liver disease in western diet-obese rats. **Acta Cir. Bras**. São Paulo, v.29, n. 9, p. 609-14, 2014.
- EGUCHI, R.; CHEIK, N. C.; OYAMA, M. L. NASCIMENTO, C. M. O.; MELLO, M. T.; TUFIK. S.; DAMASO. A.; Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**. São Paulo, v.14, n. 3, p. 182-187, 2008.

FERNANDES, T. HASHIMOTO, N. Y.; MAGALHÃES, F. C., FERNANDES, F. B., CASARINI, D. E., CARMONA, A. K., KRIEGER, J. E., PHILLIPS, M. I., OLIVEIRA, E. M. 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**, 58: 182–189, 2011

FERREIRA, J. C. B.; ROLIM, N. P. L.; BARTHOLOMEU, J. B.; GOBATTO, C. A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P. C. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. São Paulo, v. 34, n. 8, p. 760-765, 2007.

FRANTZ, E. D. C.; MEDEIROS, R. F.; GIORI, I. G.; LIMA, J. B. S.; BENTO-BERNARDES, T.; GAIQUE, T. G.; FERNANDES-SANTOS, C.; FERNANDES, T.; OLIVEIRA, E. M.; VIERA, C. P.; CONTE-JUNIOR, C. A.; OLIVEIRA, K. J.; NOBREGA, A. C. L. Exercise training modulates the hepatic renin-angiotensin system in fructose-fed rats. **Exp Physiol**. Rio de Janeiro, v. 9, n. 102, p. 1208-1220, 2017.

GANS, M.; CSAK, T.; SZABO, G.; High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. **World Journal of Gastroenterology**. Massachusets, v.20, n.26, p. 8525-8534, 2014.

GAVITO, A. L.; BAUTISTA, D.; SUAREZ, J.; BADRAN, S.; ARCO, R.; PAVÓN, F. J.; SERRANO, A. RIVERA, P.; DECARA, J.; CUESTA, A. L.; RODRÍGUEZ- DE-FONSECA, F.; BAIXERAS, E. Chronic IL-6 Administration Desensitizes IL-6 Response in Liver, Causes Hyperleptinemia and Aggravates Steatosis in Diet-Induced-Obese Mice. **PLoS One**. Malaga, v.6, n. 11, 2016.

GEISLER, C. E.; RENQUIST, B. J. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. **J Endocrinol**. Arizona, v. 1, n. 234, 2017.

GEORGESCU, E. F. Angiotensin receptor blockers in the treatment of NASH/NAFLD: could they be a first-class option? **AdvTher**. Craiova, v.25, n11, p. 1141-74, 2008.

GHAREGHANI, P.; SHANAKI, M.; AHMADI, S.; KHOSHDEL, A. R.; REZVAN, N.; MESHKANI, R.; DELFAN, M.; GORGANI-FIRUZJAEI, S. Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice. **Obes Res Clin Pract**. Shiraz, v. 17, 2017.

GHOLAM, P. M.; FLANCBAUM, L.; MACHAM, J. T.; CHARNEY, D. A.; KOTLER, D. P. Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects. **Am J Gastroenterol**. New York, v. 2, n. 102, p. 399-408, 2007.

GOMES-SANTOS, I. L.; FERNANDES, T.; COUTO, G. K.; FERREIRA-FILHO, J. C.; SALEMI, V. M.; FERNANDES, F. B.; CASARINI, D. E.; BRUM, P. C.; ROSSONI, L. V.; DE OLIVEIRA, E. M.; NEGRAO, C. E. Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats. **PLoS One**. São Paulo, v. 5, n. 23, p. e98012, 2014.

GOH, G. B.; PAGADALA, M. R.; DASARATHY, J.; UNALP-ARIDA, A.; RUTH Sargent, R.; CAROL AWKINS, C.; ACHUTHAN SOURIANARAYANANE, A.; AMER KHIYAMI, A.; LISA YERIAN, L.; RISH PAI, R.; MCCULLOUGH, A. J.; SRINIVASAN DASARATHY, S. Renin-angiotensin system and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. **Liver Int**. Cleveland, v.3, n. 35, p. 979-85, 2014.

GOLLISCH, K. S. C.; BRANDAUER, J.; JESSEN, N.; TOYODA, T.; NAYER, A.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**. Boston, v. 297, p. 495-504, 2009.

GU, Q.; WANG, B.; ZHANG, X. F.; MA, Y.; LIU, J. D.; WANG, X. Z. Contribution of renin-angiotensin system to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Cardiovasc Pathol**. Xi'an, v. 5, n. 23, p. 298-305, 2014.

HE, L.; ZHOU, X.; HUANG, N.; LI, H.; TIAN, J.; LI, T.; YAO, K.; WU, G.; NYACHOTI, C. M.; KIM, S. W.; YIN, Y. The Mechanism of AMPK Regulation on Glucose, Lipid and Protein Metabolic Homeostasis and Its Related Physiologically Nutritional Significance. **Curr Protein Pept Sci**. Hunan, [Epub ahead of print], 2016.

HENNIGAR, S. R.; MCCLUNG, J. P.; PASIAKOS, S. M. Nutritional interventions and the IL-6 response to exercise. Natick. **FASEB J**, v.9, n.31, p. 3719-3728, 2017.

HENRIKSEN, E. J.; PRASANNARONG, M. The role of the renin-angiotensin system in the development of insulin resistance in skeletal muscle. **Mol Cell Endocrinol**. Tucson, v. 25, n. 12, p. 15-22, 2013.

HOUGHTON, D.; THOMA, C.; HALLSWORTH, K.; CASSIDY, S.; Hardy, T.; Burt, A. D.; TINIAKOS, D.; HOLLINGSWORTH, K. G.; TAYLOR, R.; Day C. P.; MC PHERSON, S. S.; ANSTEE, Q. M.; TRENELLI, M. Exercise Reduces Liver Lipids and Visceral Adiposity in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis in a Randomized Controlled Trial. **Clin Gastroenterol Hepatol**. Newcastle, v.1, n.15, 2017.

HIGA, T. S.; BERGAMO, F. C. MAZZUCATTO, F.; FONSECA-ALANIZ, M. H.; EVANGELISTA, F. S.; Physical training prevents body weight gain but does not modify adipose tissue gene expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. São Paulo, v. 45, n. 10, p. 988-994, 2012.

HIGA, T. S.; SPINOLA, A. V.; FONSECA-ALANIZ, M. H.; EVANGELISTA, F. S. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**. São Paulo, v. 13, n. 1, p. 47-54, 2014.

HIGA, T.S. ; SPINOLA, A.V. ; FONSECA-ALANIZ, M.H. ; EVANGELISTA, F.S. . Remodeling of white adipose tissue metabolism by physical training prevents insulin resistance. *Life Sciences*, São Paulo, v. 103, p. 41-48, 2014.

HIGUCHI, N.; KATO, M.; TANAKA, M.; MIYAZAKI, M.; TAKAO, S.; KOHJIMA, M.; KOTOH, K.; ENJOJI, M.; NAKAMUTA, M.; TAKAYANAGI, R. Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease. **Exp. Ther. Med.** Fukuoka, v.6, n. 2, p. 1077-1081, 2011.

HOU, X.; XU, S.; MAITHAND-TOOLAN, K. A.; SATO, K.; JIANG, B.; IDO, Y.; LAN, F.; WALSH, K.; WIERZBICKI, M.; VERBEUREN, T. J.; COHEN, R. A.; ZANG, M.; SIRT1 Regulates Hepatocyte Lipid Metabolism through Activating AMP-activated Protein Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**. Boston, v. 283, n. 29, p. 20015-20026, 2008.

HOUGHTON, D.; THOMA, C.; HALLSWORTH, K.; CASSIDY, S.; Hardy, T.; Burt, A. D.; TINIAKOS, D.; HOLLINGSWORTH, K. G.; TAYLOR, R.; Day C. P.; MC PHERSON, S. S.; ANSTEE, Q. M.; TRENELLI, M. Exercise Reduces Liver Lipids and Visceral Adiposity in Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis in a Randomized Controlled Trial. **Clin Gastroenterol Hepatol**. Newcastle, v.1, n.15, 2017.

HOWARD, J.K.; FLIER, J. S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends Endocrinology and Metabolism**. London, v. 9, n. 17, p. 365-71, 2006.

IQBAL, J.; WALSH, M. T.; HAMMAD, S. M.; CUCHEL, M.; TARUGI, P.; HEGELE, R. A.; DAVIDSON, N. O.; RADER, D. J.; KLEIN, R. L.; HUSSAIN, M. M. Microsomal Triglyceride Transfer Protein Transfers and Determines Plasma Concentrations of Ceramide and Sphingomyelin but Not Glycosylceramide. **J Biol Chem.** Charleston, v.43, n.290, p.25863-75, 2015.

ISHIZAKA, N.; HONGO, M.; SAKAMOTO, A.; SAITO, K.; FURUTA, K.; KOIKE, K.; Liver lipid content is reduced in rat given 7-day administration of angiotensin II. **Journal of Renin-Angiotensin –Aldosterone System.** Tokyo, v. 12, n. 4, p. 462-468, 2011.

JI, Y.; WANG, Z.; LI, Z.; ZHANG, A.; JIN, Y.; CHEN, H.; LE, X. Angiotensin II Enhances Proliferation and Inflammation through AT1/PKC/NF- κ B Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma Cells. **Cell Physiol Biochem.** Xi'an, v.1, n.39, p.13-32, 2016.

JORGE, A. S.; ANDRADE, J. M.; PARAISO, A. F.; JORGE, G. C.; SILVEIRA, C. M.; DE SOUZA, L. R.; SANTOS, E. P.; GUIMARAES, A. L.; SANTOS, S. H.; DE-PAULA, A. M. Body mass index and the visceral adipose tissue expression of IL-6 and TNF- α are associated with the morphological severity of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with class III obesity. **Obes Res Clin Pract.** Montes Claros, doi: 10.1016/j.orcp.2016.03.009. [Epub ahead of print], 2016.

KATSAGONI, C. N.; GEORGOULIS, M.; PAPATHEODORIDIS, G. V.; PANAGIOTAKOS, D. B.; KONTOGIANNI, M. D. Effects of lifestyle interventions on clinical characteristics of patients with non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. **Metabolism.** Athens, n. 68, p. 119-132, 2017.

KAWAGUCHI, T.; SHIBA, N.; MAEDA, T.; MATSUGAKI, T.; TAKANO, Y.; ITOU, M.; SAKATA, M.; TANIGUCHI, E.; NAGATA, K.; SATA, M. Hybrid training of voluntary and electrical muscle contractions reduces steatosis, insulin resistance, and IL-6 levels in patients with NAFLD: a pilot study. **Journal of Gastroenterology.** Kurume, v. 6, n 46, p. 746-757, 2011.

KENNEALLY, S.; SIER, J. H.; MOORE, J. B. Efficacy of dietary and physical activity intervention in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review. **BMJ Open Gastroenterol.** Belo Horizonte, v. 1, n. 4, 2017.

- KHAOSHBATEN, M.; GHOLAMI, N.; SOKHTEHZARI, S.; MONAZAMI, A. H.; NEJAD, M. R.; The effect of an aerobic exercise on serum level of liver enzymes and liver echogenicity in patients with non alcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology and Hepatology**. Tabriz, v. 6, p. 112-116, 2013.
- KIM, S. H.; LIM, Y.; PARK, J. B.; KWAK, J. H.; KIM, K. J.; KIM, J. H. SONG, H.; CHO, J. Y.; HWANG, D. Y.; KIM, K. S.; JUNG, Y. S. Comparative study of fatty liver induced by methionine and choline-deficiency in C57BL/6N mice originating from three different sources. **Lab Anim Res**. Busan, v. 2, n. 33, p. 157-164, 2017.
- KIM, J. S.; LEE, Y. H.; KIM, J. C.; KO, Y. H.; YOON, C. S.; YI, H. K. Effect of exercise training of different intensities on anti-inflammatory reaction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biol Sport**. Jeonju, v. 31, n. 1, p. 73-9, 2014.
- KLOET, A., KRAUSE E. G., WOODS, S. C. The Renin Angiotensin System and the Metabolic Syndrome. **Physiol Behav**. Cincinnati, v.5, n.100, p. 525–534, 2010.
- KOMINE, S.; AKIYAMA, K.; WARABI, E.; OH, S.; KUGA, K. ISHIGE, K.; TOGASHI, S, YANAGAWA, T.; SHODA, J. Exercise training enhances in vivo clearance of endotoxin and attenuates inflammatory responses by potentiating Kupffer cell phagocytosis. **Sci Rep**. Ibaraki, v. 1, n.7, 2017.
- KOOPMAN, R.; SCHAART, G.; HESSELINK, M. K. C. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. **Histochemistry and Cell Biology**. Maastricht, v. 1, n.116, p. 63-68, 2001.
- KRISHNAN, A.; ABDULLAH, T. S.; MOUNAJJED, T.; HARTONO, S.; MC CONICO, A.; WHITE, T.; LE BRASSEUR N.; LANZA, I.; NAIR, S.; GORES, G.; **CHARLTON**, M. A longitudinal study of whole body, tissue, and cellular physiology in a mouse model of fibrosing NASH with high fidelity to the human condition. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. Minnesota, v. 6, n. 312, p. 666-680, 2017.
- KURBATOVA, I. V.; DUDANOVA, O. P. Features of a necrotic and inflammatory process in different forms of nonalcoholic fatty liverdisease. **Ter Arkh**. Petrozavodsk, v. 2, n. 89, p. 52-58, 2017.

LEE, J.; CHO, J. .; KIM, W. K. Anti-inflammation effect of Exercise and Korean red ginseng in aging model rats with diet-induced atherosclerosis. **Nutr Res.** Han-Yang, v. 3, n. 8, p. 284-91, 2014.

LEPORE, S. M.; MORITTU, V. M.; CELANO, M.; TRIMBOLI, F; OLIVERIO, M.; PROCOPIO, A.; DI LORETO, C.; DAMANTE, G.; BRITTI, D.; BULOTTA, S.; RUSSO, D. Oral Administration of Oleuropein and Its Semisynthetic Peracetylated Derivative Prevents Hepatic Steatosis, Hyperinsulinemia, and Weight Gain in Mice Fed with High Fat Cafeteria Diet. **International Journal of Endocrinology.** Catanzaro, v. 9, Article ID 431453, 2015.

LI, N. C.; WEI, X. X.; HU, Y. L.; HOU, X.; XU, H. Aerobic exercise blocks interleukin-6 levels and germ cell apoptosis in obese rats. **Andrologia.** Yangzhou, 2017.

LINDEN, M. A.; FLETCHER, J. A.; MORRIS, E. M.; MEERS, G. M.; LAUGHLIN, M. H.; BOOTH, F. W.; SOWERS, J. R.; IBDAH, J. A.; THYFAULT, J. P.; RECTOR, R. S. Treating NAFLD in OLETF Rats with Vigorous-Intensity Interval Exercise Training. **Med Sci Sports Exerc.** Missouri, v.3, n. 47, p. 556-67, 2014.

LING, H. Y.; YAO, Q. X.; QI, Q.; YANG, S. S.; HE, J. Q.; ZHANG, K. F.; Hu, B. The role of arecoline on hepatic insulin resistance in type 2 diabetes rats. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi.** China, v. 3, n, 30, p. 208-12, 2014.

LIU, Q.; PAN, R.; DING, L.; ZHANG, F.; HU, L.; DING, B.; ZHU, L.; XIA, Y.; DOU, X. Rutin exhibits hepatoprotective effects in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease by reducing hepatic lipid levels and mitigating lipid-induced oxidative injuries. **Int Immunopharmacol.** Zhejiang, p. 132-141, 2017.

LIU, Q.; ZHU, L.; CHENG, C.; HU, Y.; FENG, Q. Natural active compounds from plant food and Chinese herbal medicine for nonalcoholic fatty liver disease. **Curr Pharm Des.** Shanghai, 2017.

LOVE, J. D.; SUZUKI, T.; ROBINSON, D. B.; HARRIS, C. M.; JOHNSON, J. E.; MOHLER, P. J.; JEROME, W. J.; SWIFT, L. L. Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) Associates with Cytosolic Lipid Droplets in 3T3-L1 Adipocytes. **PLoS One.** Nashville, v.8, n. 10, 2015.

MALIN, S. K.; KIRWAN, J. P. Fasting hyperglycaemia blunts the reversal of impaired glucose tolerance after exercise training in obese older adults. **Diabetes Obes Metab.** Cleveland, v.9, n. 14, p. 835-41, 2012.

MARCINKO, K.; STEINBERG, G. R.; The role of AMPK in controlling metabolism and mitochondrial biogenesis during exercise. **Exp Physiol.** Hamilton, v. 12, n. 99, p. 1581-5, 2014.

MARCUS, Y.; SHEFER, G.; SASSON, K.; KOHEN, F.; LIMOR, R.; PAPPO, O.; NEVO, N.; BITON, I.; BACH, M.; BERKUTZKI, T.; FRIDKIN, M.; BENAYAHU, D.; SHECHTER, Y.; STERN, N. Angiotensin 1-7 as Means to prevent the Metabolic Syndrome. **Diabetes.** Rehovot, v.4, n. 62, p. 1121-1130, 2013.

MARQUES, C. M. M.; MOTTA, V. F.; TORRES, T. S.; ANGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. **The Brazilian Journal of Medical and Research.** Rio de Janeiro, v. 5, n. 43, p. 409-521, 2010.

MOGHETTI, P.; BACCHI, E.; BRANGANI, C.; DONÁ, S.; NEGRI, C. Metabolic Effects of Exercise. **Front Horm Res.** Karger, v. 47, p. 44-57, 2016.

MORÁN-SALVADOR, E.; LÓPEZ-PARRA, M.; GARCÍA-ALONSO, V.; TITOS, E.; MARTÍNEZ-CLEMENTE, M.; GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; LÓPEZ-VICARIO, C.; BARAK, Y.; ARROYO, V.; CLÁRIA, J. Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. **FASEB J.** Barcelona, v. 8, n25, 2011.

MORRIS, M.; FLETCHER, J. A.; THYFAULT, J. P.; RECTOR, R. S. The role of angiotensin II in nonalcoholic steatohepatitis. **Mol Cell Endocrinol.** Missouri, v.25 n.378, p. 29-40, 2013.

MOURA, L. P.; PUGA, G. M.; BECK, W. R.; TEIXEIRA, I. P.; GHEZZI, A. C.; GLÁUCIO, A.; SILVA, G. A.; MELLO, M. A. R. Exercise and spirulina control non-alcoholic hepatic steatosis and lipid profile in diabetic Wistar rats. **Lipids in Health and Disease.** São Paulo, v. 10 p. 77, 2011.

MOTTILLO, E. P.; DESJARDINS, E. M.; FRITZEN, A. M.; ZOU, V. Z.; CRANE, J. D.; YABUT, J. M.; KIENS, B.; ERION, D. M.; LANBA, A.; GRANNEMAN, J. G.; TALUKDAR, S.; STEINBERG, G. R. FGF21 does not require adipocyte AMP-activated protein kinase (AMPK) or the phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase (ACC) to mediate improvements in whole-body glucose homeostasis. **Mol Metab.** Hamilton, v. 6, n. 6, p. 471-481, 2017.

MOYA, M.; BENET, M.; GUZMÁN, C.; TOLOSA, L.; GARCIA-MONZÓN, C.; PAREJA, E.; CASTELLI, J. V.; JOVER, R. Foxa1 Reduces Lipid Accumulation in Human Hepatocytes and Is Down-Regulated in Nonalcoholic Fatty Liver. **PLoS One.** Valencia, v. 7, n.1, 2012.

NASCIMENTO, C. M.; PEREIRA, J. R.; ANDRADE, L. P.; GARUFFI, M.; TALIB, L. L.; FORLENZA, O. V.; CANCELA, J. M.; COMINETTI, M. R.; STELLA, F. Physical Exercise in MCI Elderly Promotes Reduction of Pro-Inflammatory Cytokines and Improvements on Cognition and BDNF Peripheral Levels. **Curr Alzheimer.** São Carlos, v. 11, n. 8, p. 799-805, 2014.

NASSIR, F.; IBDAH, J. Sirtuins and nonalcoholic fatty liver disease *World J Gastroenterol.* **World J Gastroenterol.** Columbia, v. 46, n. 22, p. 10084-10092, 2016.

NEGRIN, K. A.; FLACH, R. J. R.; DiSTEFANO, M. T.; MATEVOSSIAN, A.; FRIENDLINE, R. H.; JUNG, D. KIM, J. K.; CZECHM. P. IL-1 Signaling in Obesity-Induced Hepatic Lipogenesis and Steatosis. **PLoS One.** Massachusetts, v. 9, n. 9, Published online, 2014.

NISHIOKADA, A.; MIYOSHI, M.; FUJIWARA, M.; AOYAMA-ISHIKAWA, M.; MAESHIGE, N.; TAKAHASHI, M.; HAMADA, Y.; USAMI, Y.; HONDA, M.; ARITA, M.; USAMI, M. Changes of hepatic lipid mediators associated with intake of high-fat diet for 12 weeks in endotoxemic rats using LC-ESI-MS/MS.¹Division of Nutrition and Metabolism. **Clin Nutr.** Kobe, v. 14. p. 00189-7. 2014.

NUNES-SILVA, A.; ROCHA, G. C.; MAGALHAES, D. M.; VAZ, L. N.; FARIA, M. H. S.; E SILVA, A. C. S. Physical exercise and ACE2-Angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis of the Renin Angiotensin System. **Protein Pept Lett.** Belo Horizonte, 2017.

OFIR, M.; HOCHHAUSER, E.; VIDNE, B. A.; FREMARK, D.; ARAD, M. AMP-activated protein kinase: how a mistake in energy gauge causes glycogen storage. **Harefuah**. Petah Tikva, v. 146, n. 10, p. 770-5, 813-4, 2007.

OHN, J. H.; HWANG, J. Y.; MOON, M. K.; AHN, H. Y.; KIM, H. H.; KOO, Y. D.; KIM, K. I.; CHANG, H. J.; LEE, H. S.; JANG, H. C.; PARK, Y. J. Small heterodimer partner (SHP) deficiency protects myocardia from lipid accumulation in high fat diet-fed mice. **PLoS One**. Seongnam, v.10, n.12, 2017.

OLIVEIRA, N. R.; MARQUES, S. O.; LUCIANO, T. F.; PAULI, J. R.; MOURA, L. P.; CAPERUTO, E.; PIERI, B. L.; ENGELMANN, J.; SCAINI, G.; STRACK, E. L.; LIRA, F. S.; PINHO, R. A.; ROPELLE, E. R.; SILVA, A. S.; DE SOUZA, C. T. Treadmill training increases SIRT-1 and PGC-1 α protein levels and AMPK phosphorylation in quadriceps of middle-aged rats in an intensity-dependent manner. **Mediators Inflamm**. Criciúma, Published online, 2014.

OLIVO, C. R.; MIYAJI, E. N.; OLIVEIRA, M. L.; ALMEIDA, F. M.; LOURENÇO, J. D.; ABREU, R. M.; ARANTES, P. M.; LOPES, F. D.; MARTINS, M. A. Aerobic exercise attenuates pulmonary inflammation induced by *Streptococcus pneumoniae*. **J Appl Physiol**. São Paulo, v.9, n. 117, p. 998-1007, 2014.

OLSON, J. C. Acute-on-chronic and Decompensated Chronic Liver Failure: Definitions, Epidemiology, and Prognostication. **Crit Care Clin**. Kansas City, v.3, n. 32, p.301-9, 2016.

PÁDUA, M.F.; PÁDUA, F. T.; PAULI, J. R.; SOUZA, C. T.; SILVA, A. S. R. ROPELLE, E. C. C; CINTRA, D. E; CARVALHEIRA, J. B. C; ROPELLE, E. R. Exercício Físico Reduz a Hiperglicemia de Jejum em Camundongos Diabéticos Através da Ativação da AMPK. **Revista Brasileira de Medicina Esporte**, v. 15, p. 179-184, 2009.

PARK, Y.; PRISBY, R. D.; BEHNKE, B.J.; DOMINGUEZ, J. M.; LESNIEWSKI, L. A.; DONATO, A. J.; MULLER-DELP, J.; DELP, M. D. Effects of aging, TNF- α , and exercise training on angiotensin II-induced vasoconstriction of rat skeletal muscle arterioles. **J Appl Physiol**. Lubbock, v.7, n.113, p.1091-100, 2012.

PASCHOS, P.; TZIOMALOS, K. Nonalcoholic fatty liver disease and the renin-angiotensin system: Implications for treatment. **World Journal of Hepatology**. Bari, v. 4, n. 12, p. 327-331, 2012.

PFAFFI, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**. Munich, v. 9, n. 29, p. e45, 2001.

POETA, M.; PIERRI, L.; VAJRO, P. Gut-liver axis Derangement in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Children**. Baronissi, v.8, n.4, 2017.

RAHMAN, K.; DESAI, C.; IYER, S. S.; THORN, N. E.; KUMAR, P.; LIU, Y.; SMITH, T.; NEISH, A. S.; LI, H. TAN, S.; WU, P.; LIU, X.; YU, Y.; FARRIS, A. B.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. A.; ANANIA, F. A. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol. **Gastroenterology**. Atlanta, v. 16, p. 34679-0, 2016.

RIBEIRO-OLIVEIRA, A. JR., MARQUES, M. B., VILAS-BOAS, W.W. et al. The effects of chronic candesartan treatment on cardiac and hepatic adenosine monophosphate-activated protein kinase in rats submitted to surgical stress. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**. Minas Gerais, v.3, n. 16, p.1-7, 2013.

ROCHA, A.; Bolin, A. P.; CARDOSO, C. A. L.; OTTON, R. Green tea extract activates AMPK and ameliorates white adipose tissue metabolic dysfunction induced by obesity. **Eur J Nutr**. Heidelberg, v.7, 2015.

ROMAN, E. A.; REIS, D.; ROMANATTO, T. MAIMONI, D.; FERREIRA, E. A.; SANTOS,, D.A.; TORSONI, A. S. VELLOSO, L. A.; TORSONI, M. A.; Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 alpha activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. **Mol Cell Endocrinol**. Campinas, v.1, n. 314, p. 62-9, 2016.

RONDINI, E. A.; MIADENOVIC-LUCAS, L.; ROUSH, W. R.; HALVORSEN, G.; GREEN, A. E.; GRAMMEMAN, J. G. Novel pharmacological probes reveal ABHD5 as a locus of lipolysis control in white and brown adipocytes. **J Pharmacol Exp Ther**. Wayne, 2017.

ROZEN., S; SKALETISKY., H. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. **Methods Mole Biol.** Massachusettss, v. 132, p. 365-386, 2000.

SALMINEN, A.; HYTTINEN, J. M. T.; KAARNIRANTA, K.; AMP-activated protein kinase inhibitis NF-kB signaling and inflammation: impact on health and lifespan. **J. Mol. Med.** Kuopio, v. 89, p. 667-676, 2011.

SÁNCHEZ-MUÑOZ, V.; SALAS-ROMERO, R.; DEL VILLAR-MORALES, A.; ARTÍNEZ-CORIA, E.; PEGUEROS-PÉREZ, A.; FRANCO-SÁNCHEZ, J. G.; Decrease of liver fat content by aerobic exercise or metformin therapy in overweight or obese women. **Rev. Invest Clin.** Xochimilco, v. 65, n. 4, p. 307-17, 2013.

SANTOS, R. A.; SIMOES e SILVA, A. C.; MARIC, C.; SILVA, D. M.; MACHADO, R. P.; BUHER, I.; HERINGER-WALTHER, S.; PINHEIRO, S. V.; LOPES, M. T.; BADER, M.; MENDES, E. P.; LEMOS, V. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; SCHULTHEISS, H. P.; SPETH, R.; WALTHER. T. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci.** Minas Gerais, v.14, n. 100, p.8258-63, 2003.

SCHULTZ, A.; MENDONCA, L. S.; ANGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. **Experimental and Toxicologic Pathology.** Rio de Janeiro, v.4, n. 64, p. 273-282, 2012.

SHAHID, S. M.; FATIMA, S. N.; MAHBOOB, T. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene expression in experimentally induced liver cirrhosis in rats. **Pak J Pharm Sci.** Karachi, v. 26, n. 5, p. 853-7, 2013.

SHENG, L.; SHUI, Y. Clusters of Differentiation 24 Polymorphism and Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology.** Hangshou, v. 6, n. 54, p. 2274-4, 2011.

SUNG, K. C.; RYU, S.; LEE, J. Y.; KIM, J. Y.; WILD, S. H.; BYRNE, C. D. Development of new fatty liver, or resolution of existing fatty liver, over 5 years of follow up: effect of exercise. **Hepatol.** Kangbuk, 2016.

TAN, Y.; KIM, J.; CHENG, J.; ONG, M.; LAO, W. G.; JIN, X. L.; LIN, Y. G.; XIAO, L.; ZHU, X. Q.; QU, X. Q. Green tea polyphenols ameliorate non-alcoholic fatty liver disease through upregulating AMPK activation in high fat fed Zucker fatty rats. **World J Gastroenterol**. Sydney, v. 21, n. 23, p. 3805-3814, 2017.

TANAKA, N.; AOYAMA, T.; KIMURA, S.; GONZALEZ, F. J.; Targeting nuclear receptors for the treatment of fatty liver disease. **Pharmacol Ther**. Nagano, v. 17, 2017.

TANG, Q.; JIANG, S.; JIA, W.; SHEN, D.; QIU, Y.; ZHAO, Y.; XUE, B.; LI, C.; Zoledronic acid, an FPPS inhibitor, ameliorates liver steatosis through inhibiting hepatic de novo lipogenesis. **Eur J Pharmacol**. Nanjing, 2017.

TIPINIS, S. R.; HOOPER, N. M.; HYDE, R.; KARRAN, E.; CHRISTIE, G.; TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J Biol Chem**. Kingdom, v. 275, n. 43, p.33238-43. 2000.

TOONEN, E. J.; MIREA, A. M.; TACK, C. J.; STIENSTRA, R. BALLAK, D. B.; VAN DIEPEN, J. A.; HIJMANS, A. CHAVAKIS, T.; DOKTER, W. H.; PHAM, C. T.; NETEA, M. G.; DINARELLO, C. A. JOOSTEN, L. A. Activation of proteinase 3 contributes to Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and insulin resistance. **Mol Med**. Nijmegen, v.22 n. 24, 2016.

VEIGA, F. M. S.; GRAUS-NUNES, F.; RANCHID, T. L.; BARRETO, A. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; SOUZA-MELLO, V. Anti-obesogenic effects of WY14643 (PPAR-alpha agonist): Hepatic mitochondrial enhancement and suppressed lipogenic pathway in diet-induced obese mice. **Biochimie**. Rio de Janeiro, v. 140, p. 106-116, 2017.

VERHAEGH, P.; BAVALIA, R.; WINKENS, B.; MASCLÉE, A.; JONKERS, D.; KOEK, G. Non-invasive diagnosis for differentiating non-alcoholic steatohepatitis from simple steatosis: a meta-analysis and systematic review. **Clin Gastroenterol Hepatol**. Maastricht, 2017.

VERHAEGH, P.; BAVALIA, R.; WINKENS, B.; MASCLÉE, A.; JONKERS, D.; KOEK, G. Non-invasive diagnosis for differentiating non-alcoholic steatohepatitis from simple steatosis: a meta-analysis and systematic review. **Clin Gastroenterol Hepatol.** Maastricht, 2017.

VOLYNETS, V.; MACHANN, J.; KUPER, M. A.; MAIER, I. B.; SPRUSS, A.; KONIGSRÄINER, A.; BISCHOFF, S. C.; BERGHEIM, I.; Amoderate weight reduction through dietary intervention decreases hepatic fat content in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a pilot study. **European Journal of Nutrition.** Germany, v.2, n. 52, p. 527-35, 2012.

WANG, C.; TAO, Q.; WANG, X.; WANG, X.; ZHANG, X. Impact of high-fat diet on liver genes expression profiles in mice model of nonalcoholic fatty liver disease. **Environ Toxicol Pharmacol.** Northeast, v.45, n.19, p. 52-62, 2016.

WANG, C.; YUAN, R. S.; ZHUANG, W. Z.; SUN, J. H.; WU, J. Y.; LI, H.; CHEN, J. G. Schisandra polysaccharide inhibits hepatic lipid accumulation by downregulating expression of SREBPs in NAFLD mice. **Lipids Health Dis.** Jilin City, v. 1, n. 15, p. 195, 2016.

WANG, L.; WU, S.; CAI, M.; MA, J.; LI, S.; LI, M.; XU, Y.; WEI, L.; SHANG, J. Comprehensive Study of Multiple Stages Progressing to Nonalcoholic Steatohepatitis with Subsequent Fibrosis in SD Rats. **Int J Mol Sci.** Nanjing, v. 8, n. 18, 2017.

WIDER, M. D. Metabolic syndrome and the hepatorenal reflex. **Surg Neurol.** Michigan, V. 7, N. 99, 2016.

WEI, Y.; CLARK, S. E.; MORRIS, E. M.; THYFAULT, J. P.; UPTERGROVE, G. M. E.; WHALEY-CONNELL, A. T.; FERRARIO, C. M.; SOWERS, J. R.; IBDAH, J. A. Angiotensin II – induced non-alcoholic fatty liver disease is mediated by oxidative stress in transgenic TG (mRen2)27(Ren2) rats. **National Institute of Health.** Columbia, v. 49, n. 3, p. 417-428, 2008.

WU, L.; XIE, Y. Effect of NF- κ B on the pathogenic course of non-alcoholic fatty liver disease. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.** Changsha, v. 4, n. 42, p. 463-467, 2017 .

WU, Y.; MA, K. L.; ZHANG, Y.; WEN, Y.; WANG, G. H.; HU, Z. B.; LU, J.; CHEN, P. P.; RUAN, X. Z.; LIU, B. C. Lipid disorder and intrahepatic renin-angiotensin system activation synergistically contributes to non-alcoholic fatty liver disease. **Liver Int.** Jiangsu, doi 10.1111, 2016.

YANG, S. J.; CHOI, J. M.; CHANG, E.; PARK, S. W.; PARK, C.Y. Sirt1 and Sirt6 mediate beneficial effects of rosiglitazone on hepatic lipid accumulation. **PLoS One.** Kanfbuk, v. 8, n. 9, p. e105456, 2014.

YASARI, S.; PRUD'HOMME, D.; TESSON, F.; JANKOWSKI, M.; GUTKOWSKA, J.; LEVY, E.; LAVOICE, J. Effects of Exercise Training on Molecular Markers of Lipogenesis and Lipid Partitioning in Fructose –Induced Liver Fat Accumulation. **Journal of Nutrition and Metabolism.** Montreal, v.10, p. 1155, 2012.

YVAN-CHARVET, L.; QUINARD-BOULANGE, A. Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. **Kidney Int.** New York, v. 2, n.79, p. 162-8, 2011.

ZHAN, Y.; ZHAO, F.; XIE, P.; ZHONG, L.; LI, D.; GAI, Q.; LI, .L. Hongshan Wei, Lingqiang Zhang, AN., W. Mechanism of the effect of glycosyltransferase GLT8D2 on fatty liver. **Lipids Health Dis.** Beijing, p. 14-43, 2015.

ZHANG, W.; LI, C.; LIU, B.; Wu, R.; ZOU, N.; XU, Y. Z.; YANG, Y. Y.; ZHANG, F.; ZHOU, H. M.; WAN, K. Q.; XIAO, X. Q.; ZHANG, X. Pioglitazone upregulates hepatic angiotensin converting enzyme 2 expression in rats with steatohepatitis. **Abstract Ann Hepatol.** Chongqing, v. 6, n. 12, p. 892-900, 2013.

ZHANG, W.; XU, Y.; LIU, B.; WU, R.; YANG, Y.; XIAO, X.; ZHANG, X.; Pioglitazone UprelatesAngiotensina Converting Enzyme 2 Expression in Insulin-Sensitive Tissue in Rats with High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis. **The Scientific World Journal.** Chongqing, Article ID 603409, p 7, 2014.

ZHAO, F[†] .; XIE, P[†] .; JIANG, J; ZHANG, L.; AN, W; ZHAN, Y. The Effect and Mechanism of Tamoxifen-Induced Hepatocyte Steatosis in Vitro. **Int J Mol Sci.** Beijing, v.3, n.15, p. 4019–4030, 2014.

ZHOU, D.; HLADY, R. A.; SCHAFER, M. J.; WHITE, T. A.; LIU, C.; CHOI, J. H.; MILLER, J. D.; ROBERTS, L. R.; LE BRASSEUR, N. K.; ROBERTSON, K. D. High fat diet and exercise lead to a disrupted and pathogenic DNA methylome in mouse liver. **Epigenetics**. Rochester, v. 1, n. 12, p. 55-69, 2017.

EACH

Escola de Artes, Ciências e Humanidades
da Universidade de São Paulo

Comitê de Ética em Uso de Animais em Experimentação (CEUA)

Certificamos que a proposta intitulada "**Papel do sistema renina angiotensina na prevenção da esteatose hepática através do treinamento físico em camundongos**", registrada com o n. **004/2015**, de autoria da Pesquisadora **Vanessa Cristina Fortunato Lima**, sob responsabilidade da **Prof.^a Dr.^a Fabiana S. Evangelista**, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Atividade Física da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para ingresso no mestrado, foi **APROVADO** pelo CEUA da Escola de Artes Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo (EACH/USP), em reunião de **18/04/2016**. Este projeto envolverá a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho de Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O período de validade desta autorização será equivalente ao período de realização do curso de Pós-Graduação. Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-EACH/USP, o relatório final sobre a pesquisa.

Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico c57BL/6
Número de animais	sessenta
Peso/Idade	15 a 20g – 4 semanas de idade
Sexo	macho
Origem	Biotério da Faculdade de Medicina da USP

São Paulo, 18 de abril de 2016.

Prof. Dr. Mário Pedrazzoli Neto

Vice-Coordenador
CEUA-EACH/USP