UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL

ANNA LAURA VIACAVA AMÉRICO

Prevenção da obesidade e da resistência à insulina através do treinamento físico aeróbio: papel do sistema renina angiotensina no tecido adiposo branco.

São Paulo
2019

ANNA LAURA VIACAVA AMÉRICO

Prevenção da obesidade e da resistência à insulina através do treinamento físico aeróbio: papel do sistema renina angiotensina no tecido adiposo branco.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Fabiana de Sant`Anna Evangelista

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Américo, Anna Laura Viacava
Prevenção da obesidade e da resistência à insulina através do treinamento físico aeróbio : papel do sistema renina angiotensina no tecido adiposo branco / Anna Laura Viacava Américo. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Fabiana de Sant'Anna Evangelista.

Descritores: 1.Obesidade 2.Resistência à insulina 3.Exercício 4.Tecido adiposo branco 5.Browning 6.Sistema renina-angiotensina

USP/FM/DBD-013/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos meus pais Vilma e José Carlos. Por sempre lutarem pela minha formação. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês tiveram por mim. Sempre me ensinaram a agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo, contribuindo para a minha formação pessoal e profissional.

Agradecimentos

À minha orientadora Fabiana S. Evangelista por acreditar em mim e pela dedicação ao longo desses anos. Agradeço pela confiança, pela amizade, conselhos e paciência.

À Dra. Miriam H Fonseca-Alaniz por sempre estar presente durante a minha formação acadêmica. Sendo através de ensinamentos na bancada, discussões teóricas ou mesmo de conselhos, que foram de extrema importância para o meu amadurecimento profissional.

À Dra. Patrícia Fiorino e à Dra. Vera Farah por me iniciarem na pesquisa e por contribuirem para a minha formação academica.

Aos amigos Ana Paula Leite, Renata O. Pereira, Bruno Vecchiatto, Marilia Marcondes, Luiz Felipe Martucci e Daniela Boschetti por estarem presentes tanto nos momentos bons, de troca de conhecimento, quanto nos piores dias.

Em especial à grande amiga Cynthia Rodrigues Muller, que sempre esteve ao meu lado desde a graduação, compartilhando o dia a dia na bancada, congressos e todos os momentos pessoais. Sendo uma amiga incondicional, estando sempre presente mesmo quando distante.

Ao Bruno Ditt Frigeri por estar comigo e acreditar em mim em todas as horas. Sempre me apoiando e ajudando na vida profissional e pessoal. Por fazer a vida mais leve.

Ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (LGCM) e ao Professor José Eduardo Krieger pela oportunidade de desenvolver o presente estudo em seu laboratório.

À toda a equipe do LGCM, alunos e funcionários, pela ajuda e pelas discussões enriquecedoras.

À pós-graduação e à FAPESP (2016/23783-9) pelo apoio financeiro, obrigada!

Resumo

Américo ALV. Prevenção da obesidade e da resistência à insulina através do treinamento físico aeróbio: Papel do sistema renina angiotensina no tecido adiposo branco [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A obesidade é fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina (RI), diabetes tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares, e o treinamento físico aeróbio (TFA) é recomendado para a prevenção e o tratamento de tais doenças. O sistema renina angiotensina (SRA), especificamente as alças ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang (1-7)/Mas, está envolvido no desenvolvimento e progressão da obesidade e da RI, e por isso é considerado um potencial alvo terapêutico. O objetivo do estudo foi investigar se a prevenção da obesidade e da RI está associada com a modulação das alças do SRA no tecido adiposo branco (TAB). Para isso, camundongos machos adultos C57BL6/J foram separados em grupos (n=10/grupo) sedentários (SED) alimentados com dieta normocalórica (NO) e de cafeteria (CAF) (SED-NO e SED-CAF) e treinados (TF) alimentados com dieta NO e CAF (TF-NO e TF-CAF). O TFA foi realizado simultaneamente com as dietas durante 8 semanas. Os resultados revelaram que o grupo SED-CAF apresentou maior peso corporal e adiposidade, intolerância à glicose e RI, enquanto o TFA preveniu tais prejuízos no grupo TF-CAF. No TAB periepididimal (TAB-PE), os grupos SED-CAF e TF-CAF reduziram a expressão de p-AKT, aumentaram a expressão de ATGL, p-HSL e IL-6. Embora a ECA2 sérica tenha aumentado nos grupos TF-NO e TF-CAF, e a Ang (1-7) sérica aumentado no grupo TF-NO, não houve modificação nos componentes de ambas as alças do SRA no TAB-PE. No TAB subcutâneo (TAB-SC), o TFA reduziu a razão p-AKT/t-AKT e aumentou a expressão da ATGL nos grupos TF-NO e TF-CAF e, aumentou a t-HSL e razão p-HSL/t-HSL no TF-CAF. O TFA preveniu a hipertrofia dos adipócitos no TF-CAF e aumentou a expressão da UCP-1 apenas no TF-NO. O grupo TF-CAF aumentou a expressão dos receptores AT1, AT2 e Mas, enquanto o TF-NO aumentou a Ang (1-7) e a razão Ang (1-7)/Ang II no TAB-SC. Foi observada correlação positiva entre a UCP-1 e a constante de decaimento de glicose (Kitt) e, entre a UCP-1 e a Ang (1-7). O TFA preveniu a obesidade e a RI em animais submetidos à dieta de cafeteria, e a

contribuição do TAB-PE e do TAB-SC foi por meio da redução na expressão de proteínas envolvidas na sinalização da insulina e do aumento na expressão de proteínas sinalizadoras de lipólise. Além disso, o TFA não impediu o aumento de marcador inflamatório no TAB-PE, porém preveniu o prejuízo na expressão de genes termogênicos no TAB-SC induzido pela dieta de cafeteria. A inalteração ou a modulação parcial de componentes das alças ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang(1-7)/Mas no TAB-PE sugere que o SRA não participou dos efeitos induzidos pelo TFA associados à prevenção de obesidade e RI. No entanto, no TAB-SC, o aumento na concentração de Ang (1-7) no grupo dieta normocalórica e dos receptores Mas e AT2 no grupo dieta cafeteria induzido pelo TFA, sugerem a contribuição do SRA na prevenção de obesidade e RI.

Descritores: obesidade; resistência à insulina; exercício; tecido adiposo branco; *Browning*; sistema renina angiotensina.

Abstract

Américo ALV. Prevention of obesity and insulin resistance through aerobic physical training: Role of the renin angiotensin system in white adipose tissue [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Obesity is a risk factor for the development of insulin resistance (IR), type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular disease, and aerobic exercise training (AET) is recommended for the prevention and treatment of such diseases. The renin angiotensin system (RAS), specifically the ACE/Ang II/AT1 and ACE2/Ang (1-7)/Mas, is involved in the development and progression of obesity and IR, and is therefore considered a potential therapeutic target. The aim of the study was to investigate whether the prevention of obesity and IR is associated with the modulation of the RAS axis in white adipose tissue (WAT). For this, adult male C57BL6/J mice were divided into groups (n= 10/group) sedentary (SED) fed normocaloric diet (NO) and cafeteria diet (CAF) (SED-NO and SED-CAF) and trained (TF) fed NO and CAF diet (TF-NO and TF-CAF). The AET was performed simultaneously with the diets for 8 weeks. The results showed that the SED-CAF group presented higher body weight and adiposity, glucose intolerance and IR, while AET prevented such damages in the TF-CAF group. In the periepididimal WAT (WAT-PE), the SED-CAF and TF-CAF groups reduced the expression of p-AKT, increased the expression of ATGL, p-HSL and IL-6. Although serum ACE2 increased in the TF-NO and TF-CAF groups, and Ang (1-7) increased in the TF-NO group, there was no change in the components of both RAS axis in WAT-PE. In the subcutaneous WAT (WAT-SC), AET reduced the p-AKT/t-AKT ratio and increased ATGL expression in TF-NO and TF-CAF groups and increased t-HSL and p-HSL/t-HSL ratio in TF-CAF. AET prevented adipocyte hypertrophy in TF-CAF and increased UCP-1 expression only in TF-NO. The TF-CAF group increased the expression of AT1, AT2 and Mas receptors, whereas TF-NO increased Ang (1-7) and Ang (1-7)/Ang II ratio in WAT-SC. Positive correlation was observed between UCP-1 and the glucose decay constant (Kitt) and between UCP-1 and Ang (1-7). In conclusion, AET prevented obesity and IR in animals submitted to the cafeteria diet, and the contribution of WAT-PE and WAT-SC was reducing the expression of proteins involved in insulin signaling and increasing the

expression of signaling proteins of lipolysis. In addition, AET did not prevent the increase of inflammatory marker in the WAT-PE, but prevented the loss in the expression of thermogenic genes in the WAT-SC induced by the cafeteria diet. The unalteration or partial modulation of components of the ACE/Ang II/AT1 and ACE2/Ang (1-7)/Mas axis in WAT-PE suggests that RAS did not participate in the AET-induced effects associated with prevention of obesity and IR. However, in the WAT-SC, the Ang (1-7) concentration increase in the normocaloric diet group and the Mas and AT2 receptors increase in the cafeteria diet group induced by AET suggest the association of RAS with the prevention of obesity and IR.

Descriptors: obesity; insulin resistance; exercise; adipose tissue, white; *Browning;* renin angiotensin system.

Lista de figuras

Figura 1: Tipos de tecido adiposo em roedores e humanos..... 5

Figura 2: Desenvolvimento da resistência à insulina associado à obesidade..... 8

Figura 3: Localização e função da proteína desacopladora UCP-1 na respiração mitocondrial (A) e do processo de *browning* do TAB (B)..... 10

Figura 4: Representação das alças ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang (1-7)/Mas do SRA e as ações no organismo..... 14

Figura 5: Representação do TFA..... 19

Figura 6: Representação do desenho experimental..... 22

Figura 7: Teste de esforço físico máximo realizado pré-TFA..... 27

Figura 8: Teste de esforço físico máximo pós-TFA..... 28

Figura 9: Consumo de ração durante 24 horas em gramas (A) e quilocalorias (B)..... 29

Figura 10: Consumo hídrico durante 24 horas..... 30

Figura 11: Ganho de peso corporal..... 31

Figura 12: Glicemia de jejum..... 31

Figura 13: Curva glicêmica (A) e área sob a curva (AUC) do teste de tolerância à glicose (B)..... 33

Figura 14: Curva de decaimento de glicose (A) e constante de decaimento da glicose (kITT) após a injeção de insulina (B)..... 34

Figura 15: Expressão proteica da AKT total (A), da AKT fosforilada (B), da razão AKT fosforilada/ AKT total (C) e do GLUT-4 (D) no TAB-PE..... 35

Figura 16: Expressão proteica da HSL total (A), da HSL fosforilada (B), da razão HSL fosforilada/ HSL total (C), da ATGL (D) e da perilipina (E) no TAB-PE..... 36

Figura 17: Expressão proteica da IL-6 no TAB-PE..... 38

Figura 18: Atividade da ECA no soro..... 39

Figura 19: Expressão proteica do angiotensinogênio (A), atividade da ECA (B), concentração de Ang 2 (C), expressão proteica do AT1 (D) e do AT2 (E). Quantificações realizadas no TAB-PE.... 40

Figura 20: Atividade da ECA2 no soro..... 40

Figura 21: Concentração de Ang (1-7) no soro..... 41

Figura 22: Correlação entre ECA2 sérica e AUC (A), entre ECA2 sérica e kITT (B), entre Ang (1-7) sérica e AUC (C) e entre Ang(1-7) sérica e kITT..... 42

Figura 23: Expressão proteica do angiotensinogênio (A), atividade da ECA (B), concentração de Ang II (C), expressão proteica do AT1 (D) e expressão proteica do AT2 (E) no TAB-PE..... 43

Figura 24: Atividade da ECA2 (A), concentração de Ang (1-7) (B) e expressão proteica do receptor MAS (C) no TAB-PE..... 44

Figura 25: Razão da atividade da ECA2/ECA (A) e razão da concentração dos peptídeos Ang (1-7)/AngII (B) no TAB-PE..... 45

Figura 26: Correlação entre a razão da concentração dos peptídeos Ang

(1-7)/Ang2 e a área sob a curva (A), correlação entre a razão da concentração dos peptídeos Ang (1-7)/AngII e a constante de decaimento da insulina (B) no TAB-PE..... 45

Figura 27: Expressão proteica da AKT total (A), da AKT fosforilada (B), da razão AKT fosforilada/ AKT total (C) e do transportador de glicose GLUT-4 (D) no TAB-SC..... 46

Figura 28: Expressão proteica da AMPK total (A), da AMPK fosforilada (B), da razão AMPK fosforilada/ AMPK total (C) no TAB-SC..... 47

Figura 29: Expressão proteica da HSL total (A), da HSL fosforilada (B), da razão HSL fosforilada/ HSL total (C), da ATGL (D) e da perilipina (E) no TAB-SC..... 48

Figura 30: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de TAB-SC corados com hematoxilina e eosina para a visualização da morfologia dos adipócitos no aumento de 400X (A). Diâmetro dos adipócitos em µm (B) e área dos adipócitos em μm^2 (C)..... 49

Figura 31: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de TAB-SC com marcação para UCP-1 (marcação positiva em marrom) no aumento de 400X (A). Conteúdo de UCP-1 no TAB-SC (B)..... 51

Figura 32: Expressão proteica do angiotensinogênio (A), atividade da ECA (B), concentração de Ang 2 (C), expressão proteica do AT1 (D) e expressão proteica do AT2 (E) no TAB-SC..... 52

Figura 33: Atividade da ECA2 (A), concentração de Ang (1-7) (B) e expressão proteica do receptor MAS (C) no TAB-SC..... 53

Figura 34: Razão da atividade da ECA2/ECA (A) e razão da

concentração dos peptídeos Ang (1-7)/Ang2 (B) no TAB-SC..... 54

Figura 35: Correlação entre UCP-1 e Kitt (A), UCP-1 e Ang (1-7) (B), UCP-1 e a razão de Ang (1-7) / Ang2 (C) e UCP-1 e Ang2 (D) no TAB-SC..... 55

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição nutricional e valor energético das dietas (porção de 45g)..... 18

Tabela 2: Primers para amplificação dos genes..... 23

Tabela3: Peso dos depósitos de tecidos adiposos normalizados pelo peso corporal (mg/g)..... 32

Tabela 4: Expressão de mRNA no TAB-SC..... 50

Lista de abreviaturas

ACC -	Ácido graxo carboxilase
ACL -	ATP citrato liase
ACS -	Acil-CoA sintetase
AG -	Ácido graxo
AGL -	Ácido graxo livre
AKT -	Proteína quinase B
AMPK -	Proteína Ativada por AMP
Ang (1-7)-	Angiotensina (1-7)
Ang I -	Angiotensina I
Ang II -	Angiotensina II
ATGL -	Lipase de triacilglicerol do adipócito
AUC -	Área sob a curva
CoA -	Coenzima A
Cox-2 -	Ciclo-oxigenase-2
DGAT -	Diacilglicerol acil transferase
DM2 -	Diabetes Mellitus tipo 2
ECA -	Enzima conversora de angiotensina
ECA2 -	Enzima conversora de angiotensina 2
EPM -	Erro padrão da média
FAS -	Ácido graxo sintetase
FATP -	Proteína transportadora de ácido graxo
GLUT-4 -	Transportador de glicose tipo 4
GPAT -	Glicerol-3 fosfato acil transferase
HSL -	Lipase hormônio sensível
IL-6 -	Interleucina 6
IL1 β -	Interleucina 1 β
IRS 1/2 -	Receptor da insulina 1 e 2
Kitt -	Constante de decaimento da glicose

LPL - Lipase de lipoproteínas
MAGL - Lipase de monoacilglicerol
MAPK - MAP quinase
MrgD - Proteína G acoplada ao receptor relacionado ao Mas
mTOR - Proteína alvo de rapamicina em mamíferos
NEP - Endopeptidase neutra
OMS - Organização Mundial da Saúde
PCP - Prolil carboxipeptidase
PDK - Proteína quinase dependente de fosfoinositídeos
PEP - Prolil endopeptidase
PGC1α - Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PI3K - Fosfatidil inositol 3 quinase
PKA - Proteína quinase A
PPAR γ - Proliferadores de peroxissoma gama
RI - Resistência à insulina
SOCS3 - Proteína supressora da sinalização de citocina 3
SRA - Sistema renina angiotensina
TAB - Tecido adiposo branco
TAB-PE - Tecido adiposo branco periepididimal
TAB-RP - Tecido adiposo branco retroperitoneal
TAB-SC - Tecido adiposo branco subcutâneo
TAM - Tecido adiposo marrom
TFA - Treinamento físico aeróbio
TG - Triacilglicerídeo
TLR4 - Receptor do tipo toll-like
TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa
TTG - Teste de tolerância à glicose
TTI - Teste de tolerância à insulina
UCP-1 - Proteína desacopladora 1

Sumário

Resumo..... v

Abstract..... vii

Lista de figuras..... ix

Lista de tabelas..... xiii

Lista de abreviaturas..... xi

1. Introdução..... 1

2. Revisão de literatura..... 3

2.1 Características morfofuncionais do tecido adiposo..... 3

2.2 Tecido adiposo, obesidade e resistência à insulina..... 7

2.3 Sistema renina angiotensina e doenças metabólicas..... 11

2.4 Treinamento físico aeróbio e prevenção de doenças metabólicas..... 14

3. Objetivos..... 17

3.1 Geral..... 17

3.2 Específicos..... 17

4. Materiais e métodos..... 18

4.1. Amostra..... 18

4.2. Dietas alimentares..... 18

4.3. Protocolo de treinamento físico aeróbio..... 19

4.4. Teste de esforço físico máximo..... 19

4.5. Determinação do peso corporal, consumo de ração e hídrico..... 20

4.6 Avaliações glicêmicas..... 20

4.7 Procedimento de morte e coleta dos tecidos e sangue..... 21

4.8 Desenho experimental…… 21

4.9 Quantificação mRNA..... 22

4.10 Quantificação proteica..... 23

4.11 Morfologia do TAB-SC..... 24

4.12 Imunohistoquímica..... 24

4.13 Dosagem da atividade da ECA e da ECA2..... 25

4.14 Quantificação das angiotensinas..... 25

4.15 Análise estatística..... 26

5. Resultados..... 27

5.1. Capacidade aeróbia..... 27

5.2 Consumo de ração e água..... 28

5.3. Peso corporal e de tecidos adiposos..... 30

5.4 Metabolismo glicêmico..... 32

5.5. Respostas no TAB-PE..... 36

5.5.1 Marcadores de metabolismo tecidual..... 36

5.5.2 Marcador de inflamação: citocina IL-6..... 39

5.5.3 SRA..... 39

5.6 Resposta no TAB-SC..... 46

5.6.1 Marcadores de metabolismo tecidual..... 46

5.6.2 Morfometria..... 49

5.6.3 Marcadores de termogênese/*browning*: mRNA e UCP1..... 50

5.6.4 SRA..... 51

6. Discussão..... 56

6.1 TAB-PE..... 59

6.2 TAB-SC..... 65

7. Conclusão..... 70

8. Referências bibliográficas..... 71

1. Introdução

A obesidade é uma doença crônica e epidêmica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo branco (TAB). É resultante do balanço energético positivo, decorrente da redução na prática de exercício físico e do aumento no consumo de alimentos com alto teor calórico, com adição de açúcares e de gordura (OMS, 2017; DIAS, 2011; PEREIRA, 2003). A obesidade tornou-se um dos problemas mais importantes de saúde pública, pois é considerada uma das cinco principais causas de morte no mundo, sendo fator de risco para o desenvolvimento de diversas outras doenças como diabetes tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, dislipidemia, nefropatias e câncer. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 1,9 bilhão de adultos com mais de 18 anos apresentavam excesso de peso corporal em 2016. Acima de 650 milhões de adultos foram diagnosticados com obesidade, o equivalente à 13% da população adulta do mundo (11% dos homens e 15% das mulheres). No Brasil, de acordo com os dados publicados pelo Ministério da Saúde, o sobrepeso e a obesidade atingem 53,8% e 18,9% da população brasileira, respectivamente (VIGITEL, 2017).

Devido à alta taxa de morbidade e mortalidade, a prevenção da obesidade tem sido cada vez mais preconizada mundialmente (OMS, 2017; IASO, 2012). A investigação dos mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento e na progressão das doenças metabólicas, como por exemplo, a obesidade e o DM2, pode contribuir diretamente para a descoberta de potenciais alvos terapêuticos. Nesse contexto, os estudos envolvendo o sistema renina-angiotensina (SRA) têm sido amplamente abordados na literatura.

O SRA é composto por uma cascata coordenada de proteínas e hormônios peptídicos, amplamente estudado como determinante da homeostase e da hemodinâmica cardiovascular, em função das ações que exerce sobre a regulação da pressão arterial e do balanço de fluídos e eletrólitos (INAGAMI *et al*., 1994; OIGMAN & NEVES, 2000). Estudos mostraram que os componentes do SRA são expressos pelos adipócitos do TAB e exercem papel importante na progressão da resistência à insulina

(RI) e do DM2 (PAHLAVANI *et al*., 2017; SLAMKOVA *et al*., 2016). A 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) está associada com prejuízos teciduais observados nas doenças metabólicas (PAHLAVANI *et al*., 2017; SANTOS *et al*., 2015; TABONY *et al*., 2011; BAILEY *et al*., 2013). No TAB, a Ang II promove crescimento e diferenciação de adipócitos (SLAMKOVA *et al*., 2016; ZORAD *et al*., 2006), induz aumento na atividade de enzimas lipogênicas (PAHLAVANI *et al*., 2017; MARCUS *et al*., 2013), obesidade e progressão do DM2 (SLAMKOVA *et al*., 2016; STERN *et al*., 2013).

Por outro lado, uma alça diferente do SRA que inclui a ECA2 (enzima homóloga a ECA, que converte Ang II em Ang (1-7)), o peptídeo Angiotensina (1-7) (Ang (1-7)) e o receptor Mas (alça ECA2/Ang (1-7)/Mas) (DONOGHUE *et al*., 2000; TIPNIS *et al*., 2000; SANTOS *et al*., 2003), pode representar um alvo terapêutico para reduzir a obesidade e o DM2 (FRANTZ *et al*., 2018; CHHABRA *et al*., 2013; ECHEVERRÍA-RODRÍGUEZ *et al*., 2014). Isso se deve às ações metabólicas da Ang (1-7) no TAB, que incluem aumento da lipólise (PAHLAVANI *et al*., 2017; OH *et al*., 2012), redução da adiposidade e melhora do perfil lipídico (LOLOI *et al*., 2018; SANTOS *et al.*, 2010), atenuação das manifestações da síndrome metabólica, aumento da captação de glicose e redução do estresse oxidativo (LIU *et al*., 2011).

O treinamento físico aeróbio (TFA) tem sido amplamente utilizado para a prevenção e o tratamento da obesidade e da RI, pois proporciona a redução do peso corporal e do tecido adiposo (MARWICK *et al*., 2009; MALIN *et al.,* 2012; HIGA *et al.*, 2014), melhora a função mitocondrial e aumenta a oxidação de ácidos graxos (AG) (FRANTZ *et al*., 2018; KELLEY *et al.,* 2001). Além disso, o TFA promove outras adaptações que contribuem para a prevenção da obesidade e da RI, como por exemplo, a melhora no perfil inflamatório (ELMER *et al*., 2016; CONTI *et al.*, 2015) e a diferenciação de adipócitos com características marrons no TAB (*browning* do TAB), os quais apresentam maior capacidade termogênica e de gasto energético (FRANTZ *et al*., 2018; CHEN *et al*., 2017; SCALSO *et al*., 2014; ELSEN *et al*., 2014; BARTELT & HEEREN, 2014).

Diversos mecanismos acionados pelo TFA já foram elucidados na literatura, e é sabido que parte das respostas benéficas do TFA pode ser mediada pela redução da alça ECA/Ang II/AT1 sistêmica e tecidual (FRANTZ *et al*., 2017; SILVA *et al*., 2017; FERNANDES *et al.,* 2011; CIAMPONE *et al.,* 2011). Quanto aos efeitos do TFA sobre a alça ECA2/Ang (1-7)/Mas e a prevenção de doenças metabólicas, ainda se sabe muito pouco. Em síntese, novos estudos são necessários para o melhor entendimento dos efeitos do TFA sobre as alças do SRA no TAB e a repercussão para a prevenção da obesidade e da RI. Diante disso, o presente estudo propôs investigar se a prevenção da obesidade e da RI por meio do TFA estava associada com a modulação das alças do SRA no TAB. A hipótese testada foi de que o TFA previne a obesidade e a RI através da melhora no metabolismo de substratos energéticos e indução do *browning* no TAB, e que tais efeitos estariam associados à redução da alça ECA/Ang II/AT1 e/ou aumento da alça ECA2/Ang (1-7)/Mas no TAB.

2. Revisão de literatura

2.1 Características morfofuncionais do tecido adiposo

Essencialmente, todas as espécies animais evoluíram para armazenar energia na forma de triglicerídeos (TG) (SCHOETTL *et al*., 2018). O tecido adiposo é o principal órgão responsável pelo armazenamento de lipídios, podendo ser diferenciado em TAB ou tecido adiposo marrom (TAM). Ambos os depósitos apresentam diferentes características morfológicas, funcionais e moleculares (SCHOETTL *et al*., 2018; BÓDIS & RODEN, 2018; IBRAHIM, 2010).

O TAB contribui majoritariamente para a constituição do reservatório energético no organismo, pois as suas células (adipócitos) são capazes de armazenar lipídios no citoplasma na forma de TG. Este armazenamento ocorre em uma única gotícula lipídica, o que confere a estes adipócitos característica unilocular. Já o TAM, é formado predominantemente por adipócitos marrons contendo múltiplas pequenas gotículas lipídicas, alto conteúdo de mitocôndrias e é altamente vascularizado e inervado, de modo que quase cada célula tem seu próprio terminal nervoso. Em roedores, os

depósitos de TAM estão distribuídos nas regiões interescapular, subescapular, axilar, perirrenal e periaórtica (SCHOETTL *et al*., 2018; JEZEK *et al*., 2018). O sistema nervoso simpático regula centralmente a termogênese estimulada pela norepinefrina via receptores β3-adrenérgicos em roedores, e mais predominantemente por receptores β1-adrenérgicos em humanos (JEZEK *et al*., 2018). Diferentemente do TAB, o TAM tem como principal função a manutenção da temperatura corporal devido à alta capacidade que os adipócitos apresentam para dissipar energia na forma de calor. Além disso, a participação do TAM na manutenção da homeostase energética também foi evidenciada na literatura (SCHOETTL *et al*., 2018; BÓDIS & RODEN, 2018; RICHARD & PICARD, 2011).

Na maioria das espécies, incluindo roedores e humanos, os adipócitos são organizados em depósitos de TAB anatomicamente distintos, os quais podem ser amplamente divididos em depósitos viscerais (entre os órgãos abdominais) e subcutâneos (sob a pele). O local primário de armazenamento de energia varia entre as espécies, de forma que nos invertebrados, como anfíbios e répteis, o armazenamento ocorre preferencialmente nos depósitos viscerais, enquanto nos mamíferos esse armazenamento ocorre tanto nos depósitos viscerais quanto subcutâneos (Figura 1) (SCHOETTL *et al*., 2018).

Em humanos, o TAB subcutâneo (TAB-SC) é composto pelos depósitos cranianos, faciais, abdominais, femorais e glúteos, sendo responsáveis pela proteção contra danos mecânicos e perda de calor (ALEXANDER *et al*., 2015; KASZA *et al*., 2014). Já o TAB visceral, é formado pelos depósitos retroperitoneal, periepididimal, omental, mesentérico, mediastial e epicardial, e assim como o TAB-SC, apresenta como função a proteção dos órgãos (SCHOETTL *et al*., 2018; BÓDIS & RODEN, 2018; FONSECA-ALANIZ *et al*., 2006). No entanto, a proporção individual de TAB-SC para TAB visceral varia de acordo com a idade, sexo, nutrição, homeostase energética de depósitos específicos e genética (BJORNDAL *et al*., 2011; SHUNGIN *et al*., 2015; BÓDIS & RODEN, 2018). Dependendo das diferenças específicas pelo sexo, o TAB visceral é responsável por 6% a 20% e o TAB-SC por 80% a 90% do tecido adiposo do corpo inteiro (BÓDIS & RODEN, 2018).

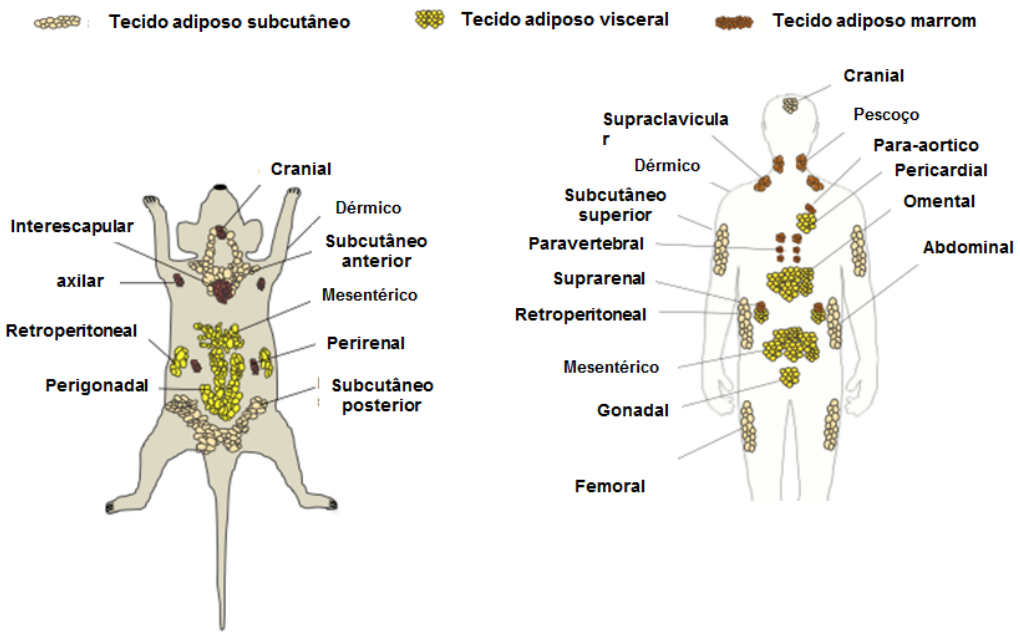


Figura 1: Tipos de tecido adiposo em roedores e humanos**.** Adaptado de SCHOETTL *et al*., 2018.

Do ponto de vista metabólico, o TAB-SC é responsável pela maior expressão de adipocinas, tais como leptina e a proteína estimulante de acilação, quando comparado aos depósitos de TAB visceral. Porém, os depósitos de TAB visceral são considerados mais ativos, por apresentarem maior sensibilidade à lipólise via catecolaminas e β-adreno receptores, maior liberação de AG, maior resistência à ação da insulina, maior secreção de adipocinas ligadas aos processos pró-inflamatórios como resistina, Ang II e interleucina 6 (IL-6). Além disso, o TAB visceral está mais relacionado com risco cardiometabólico devido ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, pró-aterogênicas e de macrófagos (BÓDIS & RODEN, 2018; FONSECA-ALANIZ *et al.,* 2006; HERMSDORFF & MONTEIRO, 2004; MARINOU *et al.,* 2010).

O TAB não é apenas responsável pelo armazenamento de lipídios na forma de TG através da lipogênese, mas também pela disponibilidade de AG pela lipólise, gerando substratos para o metabolismo energético via β-oxidação em períodos de déficit calórico. A regulação de ambos os processos ocorre através de nutrientes e sinais aferentes dos tradicionais sistemas neurais e hormonais, e depende das necessidades energéticas do indivíduo. (BÓDIS & RODEN, 2018; CINTI, 2009;

FONSECA-ALANIZ *et al*., 2006)

A lipólise ocorre a partir da ligação da noradrenalina nos receptores beta-adrenérgicos, o que permite o aumento do AMP-cíclico e a ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila a lipase hormônio sensível (HSL) nos resíduos de serina 563, 659 e 660 (ARNER, 2005; SHEN *et al.,* 1998) e as perilipinas (SZTALRYD *et al.,* 2003), permitindo assim, a hidrólise de TG. A lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) e a lipase de monoacilglicerol (MAGL) também exercem papéis importantes no processo de lipólise, sendo que a ATGL participa na fase inicial da hidrólise de TG clivando o primeiro AG e a MAGL cliva o último AG do diacilglicerol finalizado a hidrólise (ARNER, 2005; BÓDIS & RODEN, 2018). A ação da insulina promove a inibição da lipólise no TAB, reduzindo o glicerol plasmático e os AG circulantes. Durante o jejum, baixas concentrações de insulina e ativação dos receptores β-adrenérgicos pelas catecolaminas, liberadas pela estimulação do sistema nervoso simpático devido a baixos níveis sanguíneos de glicose, favorecem a quebra do triacilglicerol aumentando as concentrações de glicerol e liberação de AG pelo TAB (BÓDIS & RODEN, 2018).

O processo de lipogênese clássica é definido pela biossíntese de TG a partir da esterificação de AG complexados a coenzima A (CoA) com glicerol-3-fosfato. O glicerol-3-fosfato é obtido na via glicolítica e os AG podem ser provenientes das lipoproteínas, da biossíntese a partir de Acetil-CoA fornecida pela via glicolítica (lipogênese *de novo*), ou ainda oriundos da lipólise (FONSECA-ALANIZ *et al.,* 2006; CAWTHORN & SETHI, 2008). As lipoproteínas (quilomicrons e VLDL) compõem a maior parte dos AG fornecidos para síntese de TG (FONSECA-ALANIZ et al., 2006), sendo que, o AG é liberado a partir da hidrólise das lipoproteínas pela lipase de lipoproteína (LPL) (WANG & ECKEL, 2009). Esse AG é transportado para o interior dos adipócitos com auxílio de proteínas transportadoras como CD36 e a proteína transportadora de AG (FATP), onde é acilado com CoA formando acil-CoA pela acil-CoA sintetase (ACS) (SCHWENK *et al*., 2010; FONSECA-ALANZI *et al*., 2006). Finalmente, as enzimas glicerol-3 fosfato aciltransferase (GPAT) e diacilglicerol aciltransferase (DGAT) são responsáveis pela parte final do processo esterificando a acil-CoA juntamente com glicerol-3-fosfato em TG (BÓDIS & RODEN, 2018; SHI &

CHENG, 2008; TAKEUCHI *et al*., 2009).

Já a lipogênese *de novo*, consiste em processos metabólicos a partir de substratos diferentes de lipídeos que resultam na biossíntese e incorporação de TG nas gotículas de gordura do adipócito (BÓDIS & RODEN, 2018; SONG *et al*., 2018; FONSECA-ALANIZ *et al*., 2006). Esse processo ocorre pela conversão da citrato em acetil-CoA pela enzima ATP citrato liase (ACL) (WAKIL *et al*.,1983). A Acetil-CoA formada é convertida a malonil-CoA pela enzima ácido graxo carboxilase (ACC) que será utilizada como substrato para síntese de TG pela enzima ácido graxo sintase (FAS) (BÓDIS & RODEN, 2018; SMITH & KAHN, 2018; SONG *et al*., 2018; FONSECA-ALANIZ *et al*., 2006).

2.2 Tecido adiposo, obesidade e resistência à insulina

O TAB contribui para regulação do metabolismo glicêmico ao captar glicose via ligação da insulina ao seu receptor, seguido da fosforilação/ativação dos substratos do receptor da insulina 1 e 2 (IRS1/2). A fosforilação do IRS1/2 ativa a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) promovendo a interação entre a proteína quinase dependente de fosfoinositídeos (PDK) e a proteína quinase B (AKT), resultando na fosforilação/ativação da AKT. A AKT fosforilada realiza a translocação das vesículas contendo GLUT4 para a membrana celular, resultando na captação da glicose (SALTIEL & KAHN, 2001; HUANG & CZECH, 2007).

A participação do TAB no desenvolvimento de RI e DM2 tem sido amplamente estudada na literatura. A associação entre o aumento de adiposidade e o desenvolvimento de RI foi observada em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo em camundongos alimentados com dieta de cafeteria (HIGA *et al*., 2014). Além disso, a progressão da RI para o DM2 está diretamente associada à obesidade (IACOBINI *et al*., 2018; BAENA-DIEZ *et al.,* 2011; SORIGUER *et al.,* 2012). Isso porque o TAB, além de constituir o principal reservatório energético do organismo, exerce importante função fisiológica ao atuar como um órgão endócrino dinâmico produzindo adipocinas que estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos do organismo (JIALAL &

DEVARAJ, 2018; FONSECA-ALANIZ *et al.,* 2006). A Figura 2 ilustra alguns dos mecanismos que associa o aumento da adiposidade com o desenvolvimento de RI.

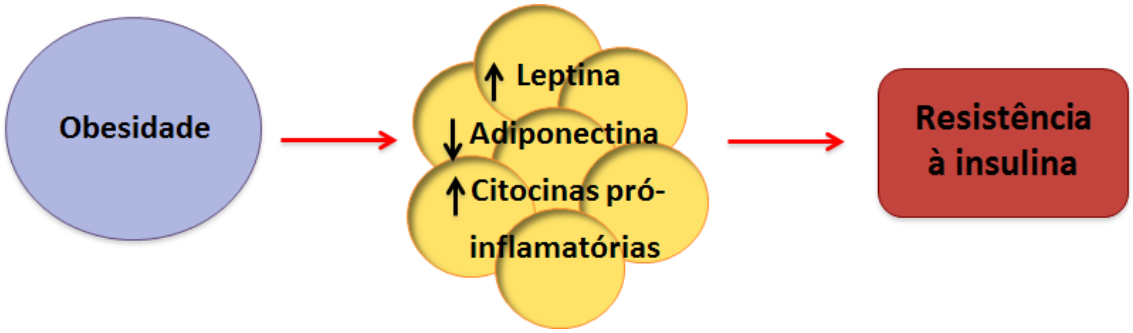


Figura 2: Desenvolvimento da resistência à insulina associado à obesidade. A hipertrofia dos adipócitos do TAB observada na obesidade resulta em prejuízo na secreção de adipocinas, as quais danificam a sinalização da insulina e provocam resistência à insulina.

A leptina, produzida pelo TAB, inibe o apetite, estimula o metabolismo energético (FRIEDMAN, 2009), aumenta a sensibilidade à insulina no TAB, no músculo esquelético e no fígado, induz a redução do conteúdo intracelular de lipídios através da ativação da proteína ativada por AMP (AMPK) e de mediadores de sinalização do sistema nervoso central (ROSEN & SIPEGELMAN, 2006). Porém, indivíduos obesos apresentam níveis elevados de leptina sérica, o que resulta no desenvolvimento de resistência à ação desse hormônio (OSWAL & YEO, 2010). Estudos com animais submetidos à dieta hipercalórica mostraram que a expressão de proteínas envolvidas na sinalização de leptina e de insulina encontra-se prejudicada nesses animais (MORRISON *et al.,* 2009).

A adiponectina, única adipocina sintetizada de maneira inversamente proporcional à adiposidade corporal, promove o aumento da oxidação de AG no músculo esquelético através da ativação do receptor por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-γ) e da AMPK (JIALAL & DEVARAJ, 2018; YOON *et al*., 2006), aumento da captação de glicose nos adipócitos (WU *et al*., 2003), aumento da secreção de insulina e redução da concentração plasmática de glicose (YAMAGUCHI *et al*., 2002). Reduções significativas na concentração da adiponectina são observadas em animais com DM2 (JIALAL & DEVARAJ, 2018; PUNYADEERA *et al*., 2005), RI (HIGA et al.,

2014; SPRANGER *et al*., 2003) e doenças cardiovasculares (JIALAL & DEVARAJ, 2018; KUMADA *et al*., 2003).

Os danos metabólicos provocados pelo aumento de adiposidade também são consequentes do aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. Animais alimentados com dieta hipercalórica apresentam aumento na expressão gênica e na concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a IL-6 (SCHOETTL *et al*., 2018; LEE *et al*., 2010; KIM *et al*., 2011). Essas citocinas podem promover RI através da inativação do receptor de insulina via fosforilação do resíduo serina (HIROSUMI *et al.,* 2002), através da indução da supressão da proteína supressora da sinalização de citocinas 3 (SOCS3) (HOWARD & FLIER, 2006) e ainda, através da produção de espécies reativas de oxigênio (HOUSTIS *et al.,* 2006).

Enquanto o TAB em excesso contribui para o desenvolvimento RI e DM2, o TAM tem sido apontado como um possível alvo terapêutico para as doenças metabólicas. Isso porque, o metabolismo lipídico no TAM está envolvido na dissipação de energia na forma de calor, reduzindo assim, a deposição de gordura e a obesidade (MONTANARI et al., 2017; ZHOU *et al.,* 2014).

A ativação simpática em adipócitos marrons induzida pelo frio aumenta a lipólise, a captação de glicose e a biogênese mitocondrial. Além disso, leva à geração de calor, e o papel central da UCP-1 para a termogênese em roedores foi confirmado em camundongos nocautes UCP1 (JEZEK *et al*., 2018). A ação da norepinefrina induz o acoplamento do receptor β-adrenérgico com uma proteína Gs que ativa a adenilil ciclase levando à formação de um segundo mensageiro, o AMPc. Subsequentemente, o AMPc promove a fosforilação mediada pela PKA de enzimas lipolíticas no citosol. Os AG oriundos da lipólise são oxidados, e as concentrações de H^+ no meio intermembrana da mitocôndria aumentam por consequência (JEZEK *et al*., 2018; CANNON & NEDERGAARD, 2004). Enquanto o gradiente de prótons da respiração oxidativa leva à síntese de ATP, a ação da UCP-1 nas mitocôndrias do TAM desacopla o gradiente de prótons, aumentando assim a liberação de energia na forma de calor (MONTANARI *et al*., 2017; JEZEK et al., 2018) (Figura 3A).

O potencial de dissipação de calor do TAB tem sido amplamente investigado em função do surgimento de células adiposas beges no TAB induzidas pelo frio, TFA ou fármacos (β3 agonistas), com grande potencial para modular o balanço energético e prevenir doenças metabólicas (FRANTZ *et al.*, 2018; CHONDRONIKOLA & SIDOSSIS, 2018). Nesse contexto, a possibilidade de diferenciar adipócitos com características marrons no TAB (*browning* do TAB), denominados de bege, que aumentam a termogênese e o gasto de energia, pode contribuir para o combate da obesidade e das suas complicações (CHONDRONIKOLA & SIDOSSIS, 2018; SEPA-KISHI & CEDDIA, 2018) (Figura 3B).

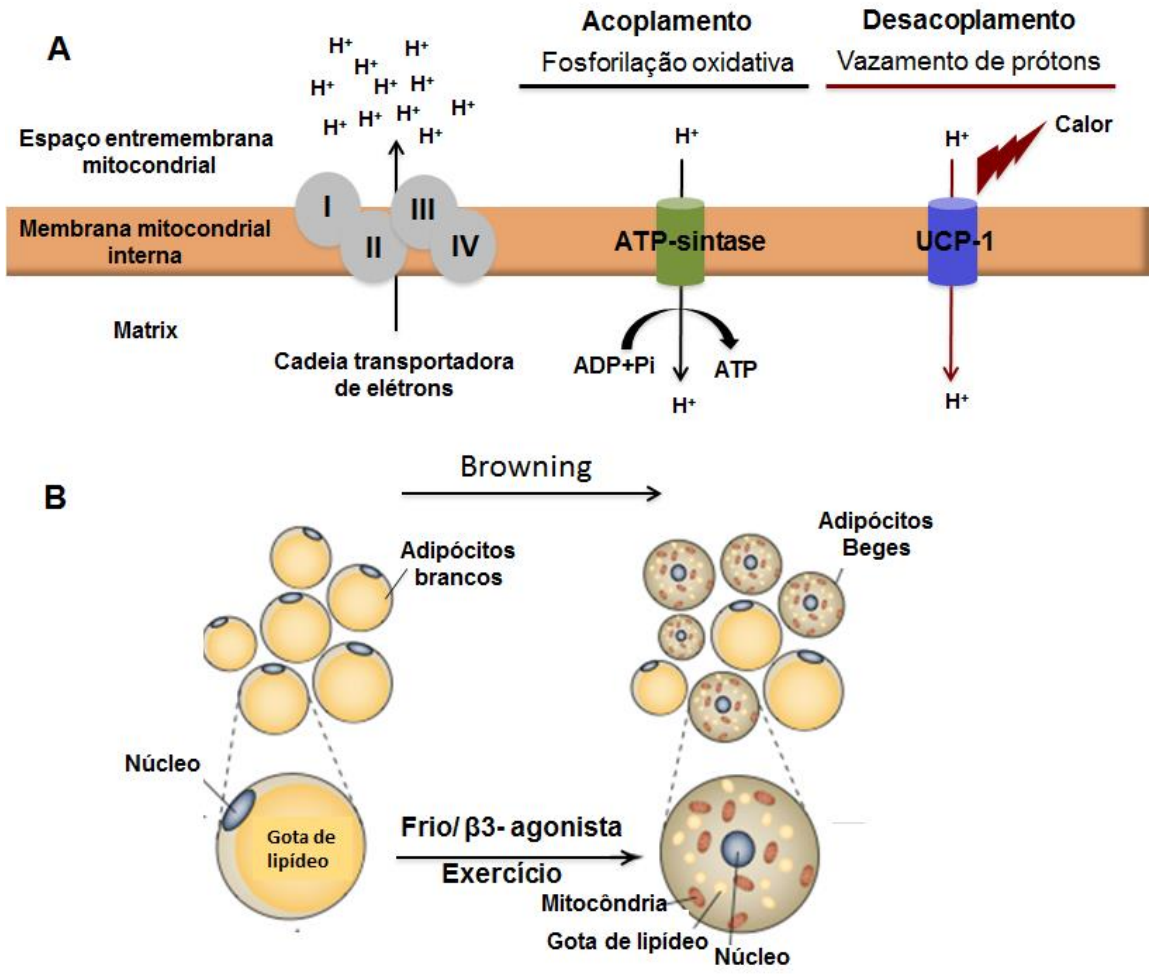


Figura 3: Componentes da respiração mitocondrial e ação da proteína desacopladora UCP-1 (A). Processo de *browning* do TAB (B) (Adaptado de Bartelt & Heeren, 2014; Brondani *et al*., 2012).

Segundo OHNO *et al*. (2012), a ativação do fator de transcrição PPARγ é fundamental para a indução da expressão de genes do TAM no TAB, já que o PPARγ ativa a PRDM16, uma importante proteína reguladora transcricional do TAM. A ativação da AMPK também pode participar do *browning* do TAB, pois a inibição dessa proteína prejudica o processo de diferenciação do TAM. Por outro lado, a estimulação da AMPK por AICAR, um ativador sintético da AMPK, resulta em aumento na expressão da UCP-1 no TAB (BEDMAR-VILA *et al.,* 2010) possivelmente em decorrência da ativação da Coativador 1 Alfa do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma (PGC-1α) (GIRI *et al.,* 2006) e/ou da inibição da cascata de sinalização induzida pelo proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) (BEDMAR-VILA *et al.,* 2010; SEPA-KISHI & CEDDIA, 2018). Apesar de a existência de diferentes mecanismos que podem induzir o *browning* do TAB, uma lacuna de conhecimento existe sobre a associação das alças do SRA com o *browning* do TAB e as repercussões para a prevenção da obesidade e da RI.

2.3 Sistema renina angiotensina e doenças metabólicas

O SRA é um sistema endócrino que apresenta como funções essenciais o equilíbrio hidromineral, o controle da função cardiovascular e também exerce papel na patogênese de doenças cardiovasculares (COLAFELLA *et al*., 2016; MARCUS *et al.,* 2013). Além dos componentes sistêmicos, estudos recentes mostram que os componentes do SRA também são expressos no TAB e exercem papel importante na progressão da RI e do DM2 (SLAMKOVA *et al*., 2016; MARCUS *et al.,* 2013).

Dentre os principais componentes do SRA circulante estão a renina, que é produzida no aparato justaglomerular renal e quando liberada na corrente sanguínea metaboliza o angiotensinogênio, que por sua vez é sintetizado no fígado. Este processo resulta na formação do decapeptídeo angiotensina I (Ang I), que posteriormente será clivado, através da ação da ECA em Ang II. A Ang II é um octapeptídeo que age preferencialmente através do receptor AT1, exercendo funções como vasoconstrição, estimulação da secreção de aldosterona, estimulação do crescimento celular e o acúmulo de colágeno. A Ang II também se liga ao receptor AT2, induzindo efeitos

opostos aos observados na interação com o receptor AT1 (COLAFELLA *et al*., 2016; BARROSO *et al*., 2002; GONÇALVES *et al.,* 2004), tais como vasodilatação, secreção de óxido nítrico e inibição do crescimento celular (SANJULIANI *et al.,* 2011).

De maneira interessante, os níveis de RNA mensageiro do angiotensinogênio são 60% maiores no TAB do que no fígado. Estudos têm demonstrado que a expressão de RNAm do angiotensinogênio é regulada por AG livres e que os glicorticóides aumentam e a insulina diminuem a expressão (BARROSO *et al*., 2002). Indivíduos obesos e resistentes à insulina apresentam maior expressão de RNAm do angiotensinogênio (BARROSO *et al.,* 2002) em função do aumento crônico da lipólise, da disponibilidade de AG na circulação e redução da ação da insulina (FONSECA-ALANIZ *et al.,* 2006).

A Ang II produzida no TAB desempenha papel importante na diferenciação de adipócitos e na sensibilidade à insulina quando age através do receptor AT1, principalmente em animais obesos e resistentes à insulina (JINJ *et al*., 2013; SLAMKOVA *et al*., 2016). A Ang II também controla a adiposidade corporal por meio da regulação da síntese e armazenamento de lipídeos, mediando o aumento no conteúdo de TG e na atividade de duas enzimas lipolíticas, a ácido graxo sintetase (FAS) e a glicerol-3-fosfato desidrogenase (BARROSO *et al.,* 2002; SLAMKOVA *et al*., 2016). A Ang II está associada ao desenvolvimento de RI, e alguns mecanismos já foram descritos, tais como inibição da secreção de adiponectina (MORI *et al.,* 2007), inibição da sinalização intracelular de insulina (MORI *et al*., 2007), aumento do estresse oxidativo e, indução da inflamação via ativação de TNF-α, MCP-1 e IL-6 (MARCUS *et al.,* 2013). Em estudos clínicos, o tratamento com bloqueadores do receptor AT1 e inibidores da ECA melhorou a RI e impediu o desenvolvimento de DM2, revelando a associação entre a hiperatividade da alça ECA/Ang2/AT1, o desenvolvimento e a progressão do DM2 (JINJ *et al.,* 2013).

Outra alça do SRA, com ação antagônica a alça ECA/Ang II/AT1, é formada pela ECA2/Ang (1-7)/Mas (FERRARIO *et al.,* 1997; SANTOS & FERREIRA, 2007; STERN *et al*., 2013). A Ang (1-7) é um heptapeptídeo formado principalmente à partir da Ang II pela ação da enzima ECA2, cujas ações são exercidas via ligação com o receptor Mas

(TALLANT *et al*., 2005; FERRARIO *et al.,* 1997; SANTOS & FERREIRA, 2007). A Ang (1-7) apresenta importantes funções cardioprotetoras, induzindo respostas opostas às da Ang II, incluindo efeitos anti-hipertensivos, anti-hipertróficos, anti-fibróticos e propriedades anti-trombóticos (GIANI *et al*., 2010; FERRARIO *et al*., 1997; SANTOS & FERREIRA, 2007).

Estudos sugerem a associação entre a redução dos componentes da alça ECA2/Ang (1-7)/Mas e a obesidade (LOLOI *et al.*, 2018; SANTOS *et al.,* 2013; WILLIAMS *et al*., 2016; ANDRADE *et al*., 2014). Além disso, ratos com aumento de Ang (1-7) apresentam redução do peso corporal e de interleucina 1 β (IL-1β) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) no TAB, refletindo em melhora no metabolismo da glicose hepática (SANTOS *et al*., 2013). A administração oral de Ang (1-7) proporciona importante redução no peso corporal e na massa de tecido adiposo, diminuição do colesterol total e triglicérides, aumento da sensibilidade à insulina, da tolerância à glicose e diminuição da expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, pode-se observar diminuição na expressão de receptor do tipo Toll (TLR4) e MAP quinase (MAPK) no fígado associada com a diminuição da ECA e aumento da ECA2 (SANTOS *et al*., 2013).

A participação da Ang (1-7) na sinalização de insulina está descrita na literatura (OH *et al*., 2012; SANTOS *et al.,* 2014). Sabe-se que a fosforilação do IRS-1 em Ser307 e Ser612 gera danos na sinalização da insulina, e que a Ang (1-7) exerce efeito positivo sobre a sinalização da insulina através da diminuição da fosforilação do IRS-1 em Ser612 e aumento da fosforilação da AKT no TAB (SANTOS *et al*., 2014). No mais, a Ang (1-7) estimula a lipólise via Mas receptor/PI3K/eNOS (OH *et al*., 2012), estimula a secreção de adiponectina, e o aumento no metabolismo de AG via ativação da AMPK. A administração oral de Ang (1-7) induz aumento dos níveis do GLUT-4 (ANDRADE *et al.,* 2014), e o aumento de Ang (1-7) sistêmica melhora o metabolismo da glicose e de lipídios (LOLOI *et al.*, 2018; BILMAN *et al*., 2012; SANTOS *et al.,* 2012). Coletivamente, os achados na literatura até o presente momento reportam que a ativação da alça ECA/Ang II/AT1 está associada a danos metabólicos e, a ativação da alça ECA2/Ang (1-7)/Mas pode ser benéfica para o controle metabólico do organismo. A Figura 4 sintetiza os principais componentes do SRA e as ações desencadeadas no

organismo.

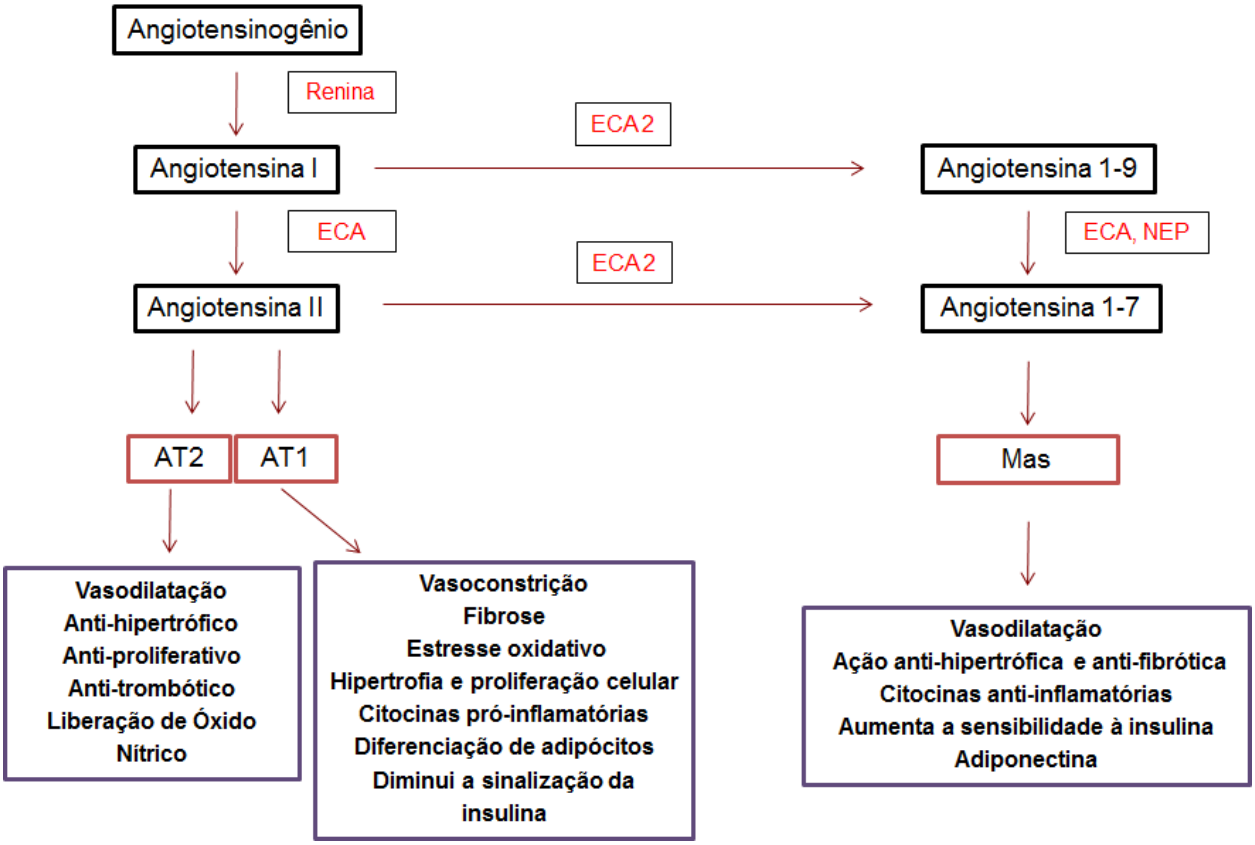


Figura 4: Representação das alças ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang (1-7)/Mas do SRA e as ações no organismo.

2.4 Treinamento físico aeróbio e prevenção de doenças metabólicas

O TFA é uma ferramenta não farmacológica que promove efeitos benéficos em parâmetros como glicemia, perfil lipídico e composição corporal (MADDEN *et al.,* 2013). Por isso, o TFA tem sido amplamente recomendado para indivíduos obesos, pois promove o aumento do gasto energético, o uso de AG como fonte de energia (LIMA-SILVA, 2006), melhora o balanço energético e reduz a adiposidade corporal (IRVING *et al.*, 2008; GOLLISH *et al*., 2009; HUNTER *et al.,* 2010; XU *et al.,* 2011), aumenta a sensibilidade do receptor de insulina e a expressão do transportador de glicose GLUT-4 (KIM *et al*., 2004), reduz os níveis de hemoglobina glicada (UMPIERRE *et al.,* 2011), refletindo em ampla melhora no perfil glicêmico (KLIMCAKOVA *et al.,* 2006). Além

disso, o TFA é capaz de alterar o balanço de marcadores pró e anti-inflamatório, reduzindo os pró-inflamatórios como TNF-alfa e MCP-1, e aumentando os anti-inflamatórios como adiponectina e IL-10 (FRANTZ et al., 2018; SPERETTA et al., 2014; PRADO *et al.*, 2010). A redução de citocinas inflamatórias também é observada em ratos diabéticos submetidos ao TFA (KIM et al., 2014).

Em um estudo prévio do nosso grupo realizado com animais alimentados com dieta de cafeteria, observamos aumento na adiposidade corporal, hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina, redução da adiponectina, prejuízos na capacidade oxidativa e aumento na capacidade lipogênica do TAB, entre outros parâmetros avaliados (HIGA *et al.,* 2014). Contudo, a associação do TFA neste modelo experimental, preveniu o aumento dos níveis de glicose em jejum, a intolerância à glicose e a hiperinsulinemia. Além disso, melhorou a atividade lipolítica, impediu o aumento das enzimas lipogênicas, melhorou a oxidação de lipídio no TAB, evitando o acúmulo de gordura e, portanto, prevenindo o desenvolvimento da resistência à insulina (HIGA *et al.,* 2014). Embora parte das respostas metabólicas do TAB tenha sido associada à ativação da via da AMPK, novos experimentos são necessários para entendermos os mecanismos envolvidos no metabolismo do TAB que participam da prevenção da obesidade e da RI com o TFA. Nesse contexto, sabendo que o SRA exerce importante papel para o controle metabólico, e que variações na massa do TAB refletem em mudanças nos componentes do SRA, este estudo se propôs a investigar a contribuição das alças do SRA para a prevenção da obesidade e da RI.

É sabido que o TFA induz o *browning* do TAB, com células adiposas com maior conteúdo mitocondrial e potencial termogênico, o que pode melhorar o potencial oxidativo e prevenir doenças metabólicas (FRANTZ *et al*., 2018; BOSTROM *et al.,* 2012). O aumento no gasto energético no TFA induz a expressão de AMPK e PGC1α, as quais podem ativar mecanismos de diferenciação dos adipócitos marrons no TAB (ZHOU *et al*., 2014; NORHEIM, *et al.,* 2014; BARTELT & HEEREN, 2014). Essa resposta pode ser benéfica para a célula adiposa, pois aumenta o potencial de dissipação de calor, e consequentemente, evita o aumento dos depósitos de TAB. No entanto, ainda existe uma lacuna de conhecimento sobre a participação das alças do SRA no *browning* do TAB induzido pelo TFA.

Os efeitos do TFA sobre os componentes do SRA e as possíveis repercussões para a prevenção e o tratamento de doenças são relativamente recentes na literatura, e em grande parte voltados para o sistema cardiovascular. É sabido que o TFA é capaz de reduzir os níveis plasmáticos de Ang II, de reduzir as concentrações de ECA e Ang II, e aumentar as concentrações de ECA2 e Ang (1-7) no coração de ratos espontaneamente hipertensos (GOMES-FILHO *et al.,* 2008). Fernandes *et al*. (2011) observaram aumento na ECA2 e Ang (1-7) no coração de ratos treinados, e Guimarães *et al*. (2012) demonstraram aumento de Ang (1-7) sistêmica em camundongos *knock out* para o receptor Mas treinados. Gomes-Santos *et al.* (2014) estudaram a alça ECA2/Ang (1-7)/Mas no músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca treinados, e revelaram que o TFA normaliza a ECA2 e reduz a ECA no plasma, mas não altera no músculo esquelético. Observou-se também aumento na razão Ang (1-7)/Ang II no plasma, normalização dos níveis de Ang II musculares e, aumento da Ang (1-7) e receptor Mas nos músculos plantar e sóleo, respectivamente. Mais recentemente, Frantz *et al.* (2017) observaram que o TFA também foi capaz de aumentar o eixo ECA2/Ang (1-7)/Mas no fígado de ratos com sobrecarga de frutose.

Considerando que o acúmulo de massa do TAB pode ser consequente do prejuízo na habilidade em lidar com o excesso de lipídios devido ao maior armazenamento e/ou redução da capacidade oxidativa tecidual, que a maior massa do TAB está associada ao desenvolvimento de RI, e que o TFA pode modular o metabolismo do TAB e os componentes do SRA, no presente estudo avaliamos os efeitos do TFA sobre as alças do SRA no TAB, o metabolismo de substratos energéticos e o *browning* do TAB.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar se a prevenção da obesidade e da RI por meio do TFA está associada com a modulação das alças do SRA ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang (1-7)/Mas no TAB.

3.2 Específicos

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

a. o peso corporal e o metabolismo de glicose;

b. a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo de glicose e de lipídio no TAB;

c. marcadores de termogênese/*browning* no TAB;

d. conteúdo de enzimas, peptídeos e receptores das alças do SRA no TAB.

4. Materiais e métodos

4.1. Amostra

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 8 semanas de vida (18 a 22g), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n= 10 animais por grupo), de acordo com o tipo de tratamento (sedentário - SED ou submetido ao treinamento físico - TF) e de dieta (normocalórica - NO ou de cafeteria - CAF): SED-NO = Sedentário alimentado com dieta normocalórica; TF-NO = Treinado alimentado com dieta normocalórica; SED-CAF = Sedentário alimentado com dieta de cafeteria; TF-CAF = Treinado alimentado com dieta de cafeteria. Todos os animais foram mantidos em local com temperatura ambiente controlada entre 22 a 24ºC e, ciclo claro-escuro invertido 12-12h, com início da fase escura às 7h e início da fase clara às 19h. Água e ração foram administradas *ad libitum*. O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP, protocolo número 002/15.

4.2. Dietas Alimentares

A composição nutricional das dietas utilizadas na pesquisa está descrita na TABELA 1. A ração de cafeteria foi preparada com 10g de chocolate ao leite derretido (Nestle®), 15g da ração convencional triturada (Nuvilab®), 10g de amendoim torrado triturado (Santa Helena), 5g de bolacha de maisena triturada (Triunfo®) e 5g de açúcar refinado (União®) (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).

Dietas	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

4.3. Protocolo de treinamento físico aeróbio

O TFA foi realizado em esteira rolante, 5 vezes por semana, durante 8 semanas (Figura 5). As sessões de TFA tiveram intensidade de 60% da velocidade máxima (mensurada durante o teste de esforço físico máximo). A duração foi progressivamente aumentada, iniciando com 30 minutos na primeira semana e atingindo 60 minutos na quarta semana, conforme descrito por FERREIRA *et al.* (2007). Os camundongos sedentários foram submetidos à caminhada na esteira, 3 vezes por semana, durante 5 minutos. Este procedimento se fez necessário para evitar qualquer interferência do estresse gerado pela esteira. O TFA foi iniciado simultaneamente à administração da dieta de cafeteria.

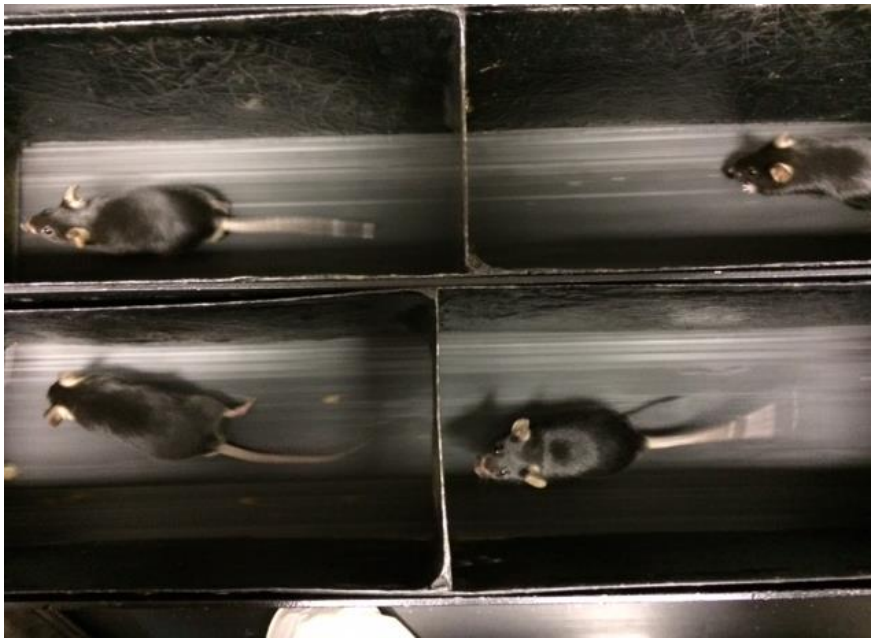


Figura 5: Representação do TFA.

4.4. Teste de esforço físico máximo

A capacidade de execução de exercício físico foi avaliada antes, na semana 4 e após o TFA em esteira rolante, através de um teste progressivo escalonado, 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 TFA.

4.5. Determinação do peso corporal, consumo de ração e hídrico

Ao longo de todo protocolo experimental, a pesagem corporal foi realizada semanalmente em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil), no mesmo dia e horário. Além da evolução do peso corporal, foi calculado o ganho de peso corporal através da diferença entre o peso corporal final (semana 8) e o peso corporal inicial (semana 0). O consumo de ração foi realizado semanalmente pesando-se a ração no início e no final de 24 horas. O consumo hídrico também foi realizado semanalmente medindo-se o volume de água no início e no final de 24 horas.

4.6 Avaliações glicêmicas

A glicemia de jejum (8h) foi avaliada após o protocolo de TFA, através de glicosímetro (AccuChek Advantage Roche Diagnostics®) em amostras de sangue retiradas da cauda dos animais, no momento antecedente aos testes glicêmicos. O teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTG) foi realizado na 8ª semana de protocolo experimental através da determinação da glicemia em amostras de sangue retiradas da cauda dos animais nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração intraperitoneal de glicose (2 g/kg de peso corporal). Os valores obtidos foram utilizados para calcular a área sob a curva (AUC) de glicose. O teste de tolerância à insulina (TTI) também foi realizado na 8ª semana de protocolo experimental, após 72h do TTG. Para isso, a curva glicêmica foi determinada após a administração intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg peso corporal; Novo Nordisk®, Paraná, Brasil), em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 e 30 minutos foram usados para calcular a constante da taxa de

desaparecimento da glicose plasmática (K_{ITT}), mediante análise da curva de decaimento de acordo com o método proposto por BONORA *et al.* (1989).

4.7 Procedimento de morte e coleta dos tecidos e sangue

Ao final do protocolo experimental (48h), das quais 8 horas de jejum, os animais foram anestesiados por injeção i.p. de tiopental de sódio (4mg / 100g de peso corporal). No momento em que o animal não mais demonstrou sinais de reflexo nas patas traseiras, foi feita a pesagem em balança digital, e em seguida, iniciada a coleta do sangue através de punção na veia cava inferior. Finalmente, foram coletados e pesados os depósitos de TAB periepididimal (TAB-PE), retroperitoneal (TAB-RP), TAB-SC inguinal e TAM interescapular. O sangue foi centrifugado a 4ºC, 12000 rpm por 10 minutos, e posteriormente, o soro foi coletado e armazenado em freezer a –80ºC. Após o procedimento de coleta, as carcaças foram congeladas e armazenadas no biotério para posterior incineração realizada por uma empresa especializada.

4.8 Desenho Experimental

Resumidamente, todos os animais realizaram teste de esforço físico máximo antes do início do TFA e da dieta. Na primeira semana de protocolo experimental, foi dado início ao TFA em esteira rolante e a dieta simultaneamente. Na quarta semana, foi realizado um novo teste de esforço físico máximo para ajuste da intensidade do treino. Na sétima semana realizamos as avaliações glicêmicas (TTG e TTI) e na oitava foi feito um novo teste de esforço físico máximo. Por fim, foi realizada a morte dos animais para a coleta de tecidos e as avaliações *in vitro* (Figura 6).

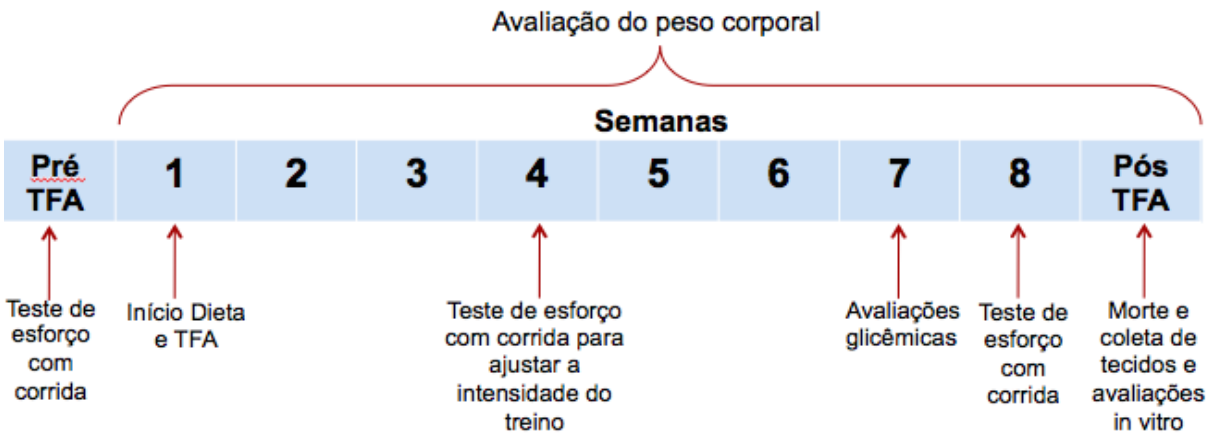


Figura 6: Representação do desenho experimental.

4.9 Quantificação mRNA

O RNA total foi extraído do depósito de TAB-SC usando o reagente TRIzol®, de acordo com as especificações técnicas do produto (Invitrogen® Life Technologies, USA). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e através da quantificação em espectrofotômetro em 260 e 280nm. Foram utilizadas apenas as amostras cuja razão 260/280nm for maior que 1,8. O cDNA foi sintetizado utilizando Superscript III RNase H-RT (Invitrogen® Life Technologies, USA) a 42ºC durante 50 min. Os *primers* utilizados para amplificação dos genes alvos estão descritos na TABELA 2. A avaliação da expressão gênica foi realizada através de PCR em tempo real (RT-PCR) e as amplificações foram avaliadas através do sistema de detecção ABI Prism 7700 SequenceDetection System (AppliedBiosystems, Foster City, CA), em placas de 384 poços, usando reagente Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems – EUA). Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Todos os genes alvo e de referência foram avaliados na mesma placa sob as mesmas condições. O método do ciclo de limiar comparativo (CT) foi utilizado para análise de dados. CT indica o número do ciclo fracionário em que a quantidade de alvo amplificado atinge um limiar fixo e ΔCT é a diferença no ciclo de limiar para o alvo e

referência (18S). Os níveis de expressão gênica são dados por 2-ΔΔCt, onde ΔΔCT é o valor de ΔCT subtraído do ΔCT do grupo controle.

Tabela 2: *Primers* para amplificação dos genes.

Gene	Foward	Reverse
UCP1	5'-CGATGTCCATGTACACCAAGGA-3'	5'-TCGCAGAAAAGAAGCCACAA-3'
UCP2	5'-GGCCTCTGGAAAGGGACTTC-3'	5'-ACCAGCTCAGCACAGTTGACA-3'
Cidea	5'-TGCTCTTCTGTATCGCCCAGT-3'	5'-GCCGTGTTAAGGAATCTGCTG-3'
18S	5'-TCGGCGTCCCCCAACTTCTTA-3'	5'-GGTAGTAGCGACGGGCGGTGT-3'

4.10 Quantificação protéica

Para esse ensaio, amostras de TAB-PE e TAB-SC foram homogeneizadas em tampão de extração na proporção 400ul para cada 200mg de tecido. Foi utilizado tampão de extração (1M HEPES; 2M NaCl; 20% SDS; 0.5M EDTA; 100mM Benzamidina; Ph=7,4), acrescido do coquetel inibidor de protease e fosfatase, sem EDTA (Thermo Scientific) na concentração de 10ul/ml. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 5 minutos a 4°C. Parte do sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína pelo kit de ensaio proteico BCATM (PIERCE Biotechnology) e parte foi armazenado a -80°C para posteriores análises por *Western Blot*. Os anti-corpos primários utilizados foram: anti-AKT total e fosforilada, anti-GLUT4, anti-AMPK total e fosforilada, anti-HSL total e fosforilada, anti-ATGL e anti-perilipina, anti-AT1, anti-AT2, anti-MAS, anti-angiotensinogênio, anti-IL-6. Além disso, utilizamos como normalizador o anticorpo anti-β-actina (Abcam, USA) e anti-GAPDH (Abcam, USA) (1:1000 em solução de BSA a 5%). Além disso, utilizamos anticorpo secundário cabra anti-coelho marcado com HRP (Invitrogen, New York, 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 Healthcare Lifescience®). A intensidade de banda foi quantificada no programa Imagem J (versão 1.43 para Windows).

4.11 Morfologia do TAB-SC

O TAB-SC foi conservado em formaldeído 4% durante 24 horas e, posteriormente mantido em álcool 70% por 48 horas para a fixação do tecido. Em seguida, os tecidos foram processados (desidratação, diafanização e parafinização do material) e incluídos em parafina. Para a análise histológica, os cortes com 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina. Após a coloração foram obtidas fotos digitalizadas das lâminas, pelo programa Leica Q Win Plus (V. 3.5.1). O estudo dos parâmetros morfológicos foi realizado por meio de microscopia ótica com o auxílio do programa Image Pro-Plus 4.1, no aumento de 400X. As variáveis diâmetro e área dos adipócitos foram obtidas a partir da mensuração de 50 adipócitos por lâmina. O dado de cada animal foi representado pela média dos 50 adipócitos, diâmetro em µm e área em μm^2.

4.12 Imunohistoquímica

Cortes de 5 µm de espessura de TAB-SC foram colocados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano-Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA). O processo de desparanifinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65º C, durante 5 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente. O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada por alta temperatura em tampão citrato com PH 6 em panela de pressão. O bloqueio da peroxidase endógena presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10v. O bloqueio de proteína foi feito com solução de PBS PH 7,6 com 0,5% BSA e 0,5% caseína (Spring). As lâminas de TAB-SC foram incubadas no anticorpo primário anti-UCP-1 (Abcan ab23841), diluído 1:1000 em solução de bloqueio de proteínas por

24 horas à 4ºC e posteriormente incubados com o anticorpo secundário N-Histofine Polímero anti-rabbit para tecido de camundongo (Nichirei Bioscience Inc.) e utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Posteriormente ocorreu a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram tiradas 10 fotos por lâmina no aumento de 400X utilizando o programa Leica QWin Plus V3. Todas as fotos foram analisadas com o programa Image Pro Plus e os resultados estão apresentados como porcentagem de marcação por área de tecido.

4.13 Dosagem da atividade da ECA e da ECA2

A atividade de ambas as enzimas foi avaliada em soro e amostras de TAB-PE e TAB-SC 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) (15uM) em 0.1M de tampão Tris-HCl contendo 50mM de NaCl e 10mM ZnCl2 pH 7.0. A atividade enzimática foi determinada medindo-se a fluorescência por 20 minutos (uma leitura por minuto). 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, 200mM NaCl, pH 7.5. Como controle negativo, foi utilizado DX600. A atividade foi expressa em UF/µg de proteína tecidual, ou em UF/mL de soro.

4.14 Quantificação das angiotensinas

Os níveis de angiotensinas foram avaliados no soro (Ang 1-7) e nos depósitos de TAB-PE e TAB-SC (Ang II e Ang (1-7)) por meio de ELISA, utilizando kits comerciais (Biomatik). Os ensaios consistem de uma técnica quantitativa imunoenzimática em sanduíche. Os anticorpos específicos para Ang II e Ang(1-7) foram pré-revestidos em microplacas. Os padrões e as amostras foram pipetados nos poços, e qualquer Ang II e Ang1-7 presentes são ligadas pelos anticorpos imobilizados. Após a remoção de

quaisquer substâncias não ligadas, os anticorpos conjugados com biotina específicos para Ang II ou Ang1-7 foram adicionados aos poços. Após a lavagem, a peroxidase conjugada com avidina (HRP) foi adicionada, e após nova lavagem para remover qualquer reagente de enzima avidina não ligado, uma solução de substrato é adicionada aos poços e a cor desenvolve-se proporcionalmente à quantidade do peptídeo de interesse. O desenvolvimento da cor é interrompido e a intensidade da cor é medida pela absorbância de 450 nm, com o comprimento de onda de correção ajustado a 540 nm. Parte do sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína pelo kit de ensaio proteico BCATM (PIERCE Biotechnology). Os resultados foram apresentados como pg/mL/ug de proteína.

4.15 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), e analisados por ANOVA de duas vias. Na presença de diferenças estatísticas significantes, foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey. Em todos os casos foi adotado nível de significância de 5% ($p<0,05$). A análise estatística foi realizada através do software Graphpad Prism 7.0.

5. Resultados

5.1. Capacidade aeróbia

Não houve diferença na velocidade máxima atingida no teste de esforço físico pré-TFA entre os grupos estudados (Figura 7). Já no teste de esforço realizado após o TFA, observamos maior velocidade máxima atingida pelos grupos TF-NO e TF-CAF comparados aos grupos SED-NO e SED-CAF (Figura 8). Esses dados confirmam a eficácia do protocolo de TFA para promover melhora na capacidade aeróbia dos animais treinados.

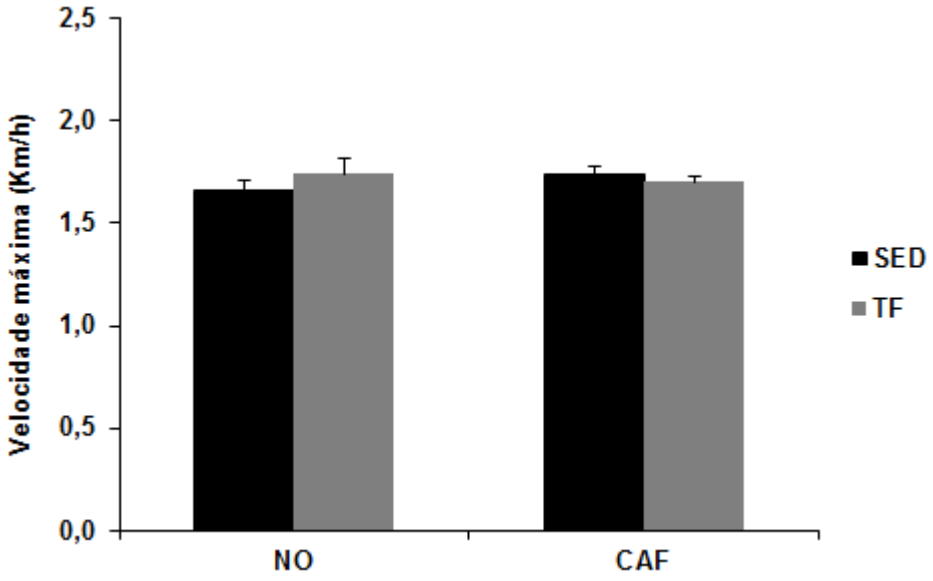


Figura 7: Teste de esforço físico máximo realizado pré-TFA (n=10/grupo).

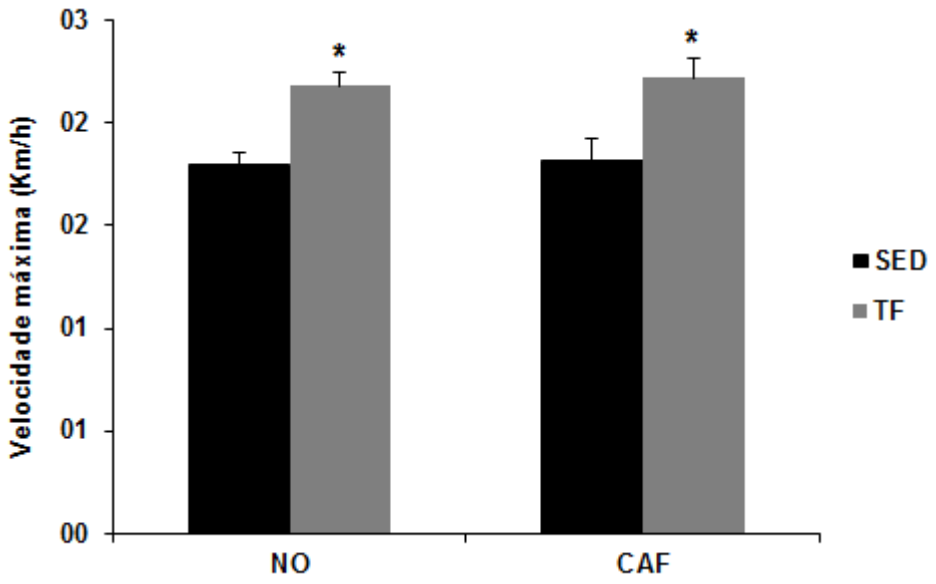


Figura 8: Teste de esforço físico máximo pós-TFA. *p<0,05 *vs* SED-NO e SED-CAF (n=10/grupo).

5.2 Consumo de ração e água

O consumo de ração em gramas por animal avaliado semanalmente não foi diferente entre os quatro grupos experimentais (Figura 9A). Da mesma forma, não observamos diferença no consumo calórico entre os grupos estudados (Figura 9B). A avaliação do consumo hídrico realizado semanalmente também não apresentou diferença entre os grupos estudados (Figura 10).

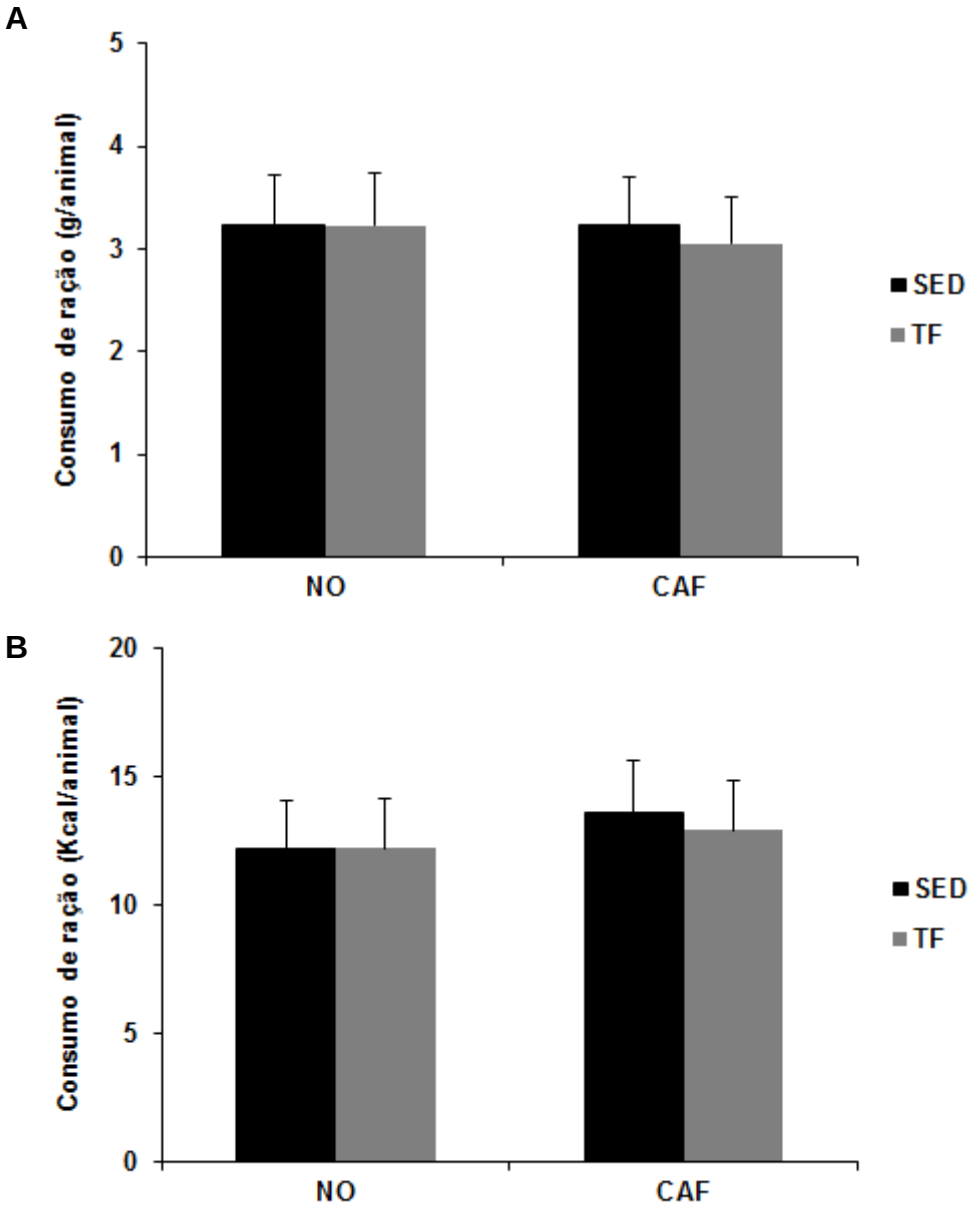


Figura 9: Consumo de ração durante 24 horas em gramas (A) e em quilocalorias (B) (n=10/grupo).

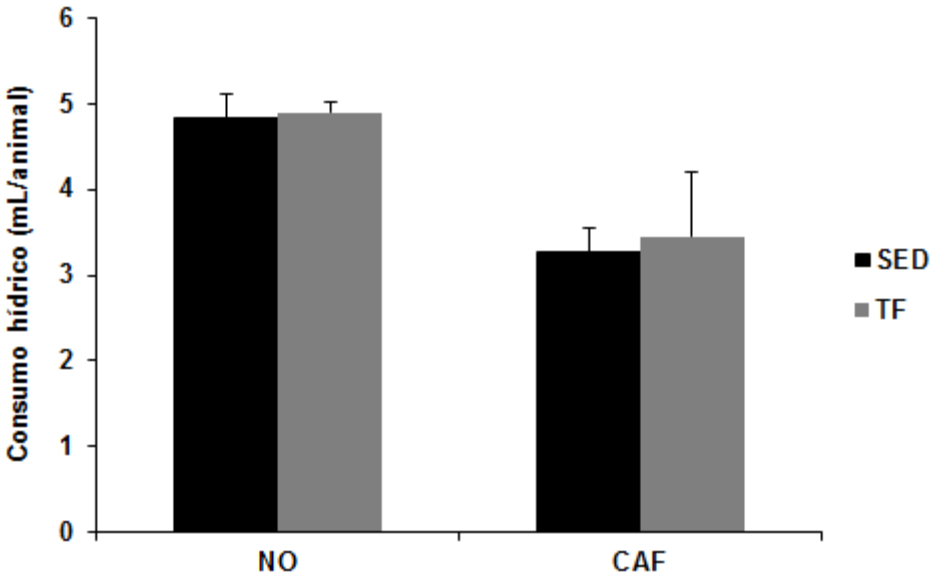


Figura 10: Consumo hídrico durante 24 horas (mL/animal) (n=10/grupo).

5.3. Peso corporal e de tecidos adiposos

Não houve diferença no peso corporal inicial entre os grupos estudados (Figura 11). Entretanto, pode-se observar que a partir da semana 3, o grupo SED-CAF apresenta peso corporal maior comparado ao grupo TF-NO. A partir da semana 5, o grupo SED-CAF apresenta maior peso corporal comparado a ambos os grupos treinados. Nas semanas 7 e 8 de protocolo experimental, o grupo SED-CAF apresentou maior peso corporal comparado aos demais grupos (Figura 11). O grupo SED-CAF apresentou ganho de peso corporal superior em 57% do grupo SED-NO, 118% do TF-NO e 81% do SED-CAF (Figura 12).

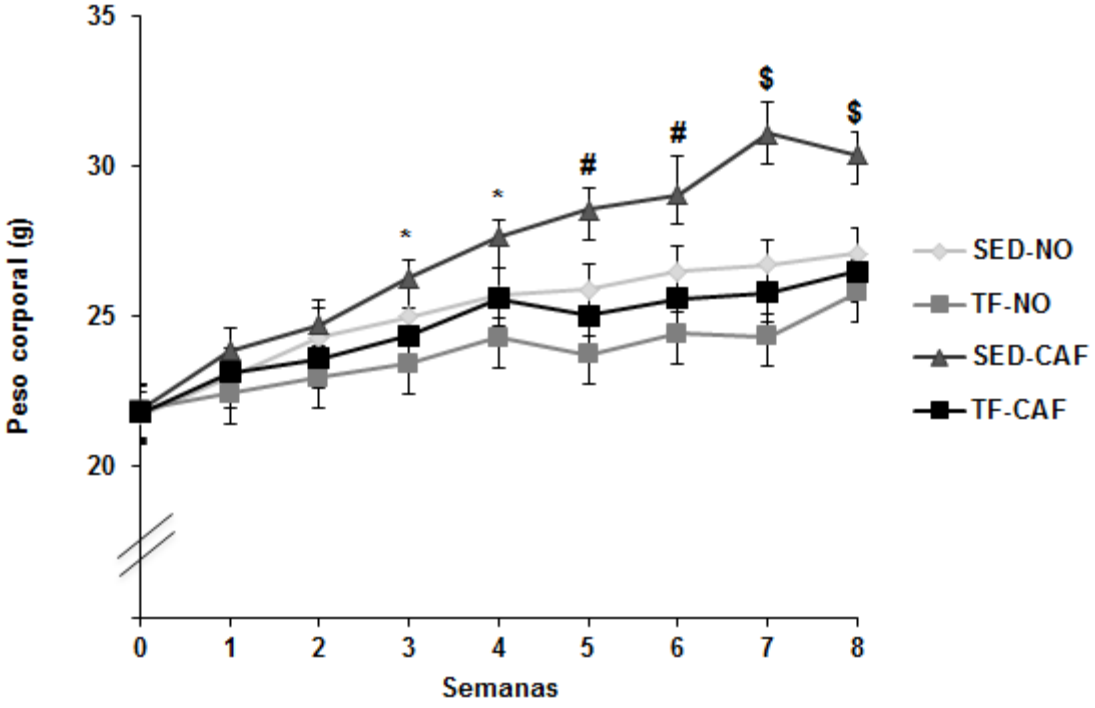


Figura 11: Evolução do peso corporal semanal. *p≤0,05 SED-CAF *vs* TF-NO, #p≤0,05 SED-CAF *vs* TF-NO e TF-CAF, $p≤0,05 SED-CAF *vs* SED-NO, TF-NO e TF-CAF (n=10/grupo).

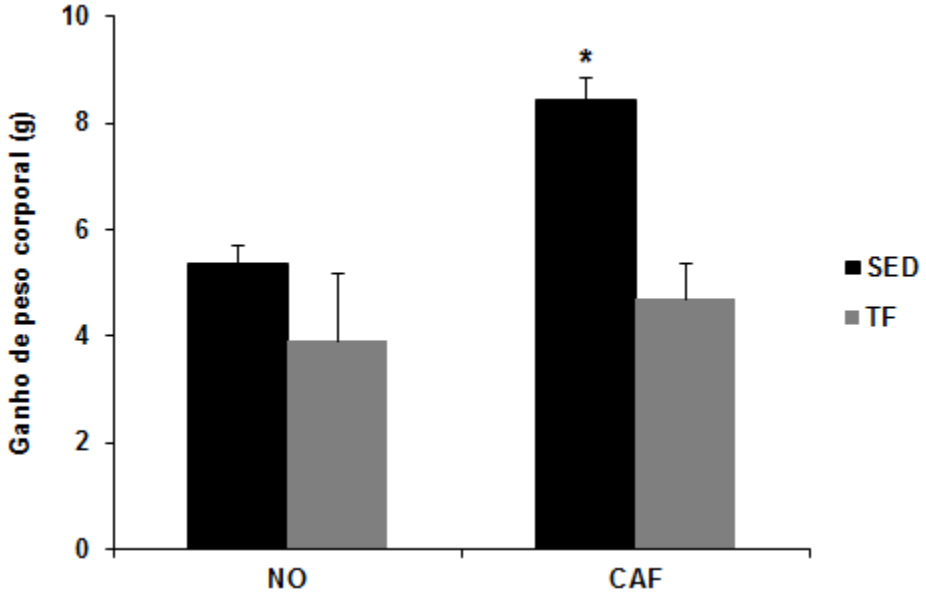


Figura 12: Ganho de peso corporal. *p≤0,05 *vs* SED-NO, TF-NO e TF-CAF (n=10/grupo).

O peso dos depósitos de TAB-SC e TAB-PE foi maior no grupo SED-CAF comparado aos grupos SED-NO e TF-NO (Tabela 3). Não observamos diferença no peso do TAB-RP e do TAM entre os grupos estudados. Esses dados revelam que o TFA foi eficiente para prevenir o aumento no peso dos depósitos de TAB-SC e TAB-PE no grupo TF-CAF.

Tabela 3: Peso dos depósitos de tecidos adiposos normalizados pelo peso corporal (mg/g).

	SED-NO (n=10)	**TF-NO (n=10)**	**SED-CAF (n=10)**	**TF-CAF (n=10)**
TAB-SC	0,011 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,029 ±0,007*	0,021 ± 0,004
TAB-PE	0,007 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,02 ± 0,005*	0,015 ±0,002
TAB-RP	0,003 ± 0,0004	0,007 ± 0,004	0,011 ± 0,002	0,007 ± 0,002
TAM	0,003 ±0,0003	0,004 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,004 ± 0,001

TAB-SC: tecido adiposo branco subcutâneo; TAB-PE: tecido adiposo branco periepididimal; TAB-RP: tecido adiposo branco retroperitoneal; TAM: tecido adiposo marrom. *$p<0,05$ *vs* SED-NO e TF-NO.

5.4 Metabolismo glicêmico

A glicemia de jejum foi avaliada na sétima semana de protocolo experimental, e conforme pode ser observado na Figura 13, os animais do grupo SED-CAF apresentaram valores superiores comparados ao grupo TF-NO.

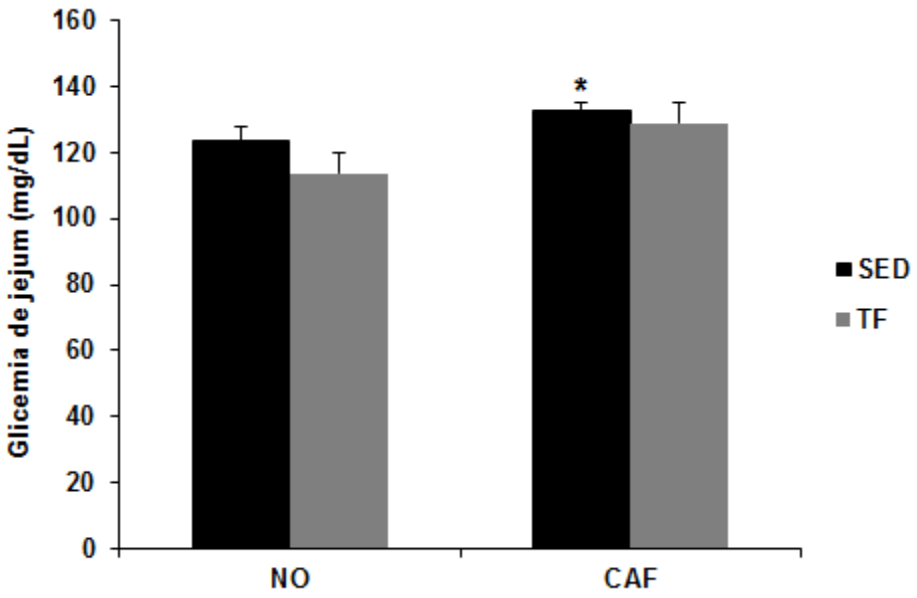


Figura 13: Glicemia de jejum. *p<0,05 *vs* TF-NO (n=10/grupo).

No teste de tolerância à glicose, os resultados da curva glicêmica do grupo SED-CAF foram maiores comparados aos demais grupos, o que demostra a ineficiência na metabolização da glicose por esse grupo (Figura 14A). Da mesma maneira, podemos observar maior área sob a curva no grupo SED-CAF comparado aos demais grupos (Figura 14B). Desta forma, esses dados confirmam a intolerância à glicose apresentada pelo grupo SED-CAF e que o TFA foi capaz de prevenir esta resposta no grupo TF-CAF.

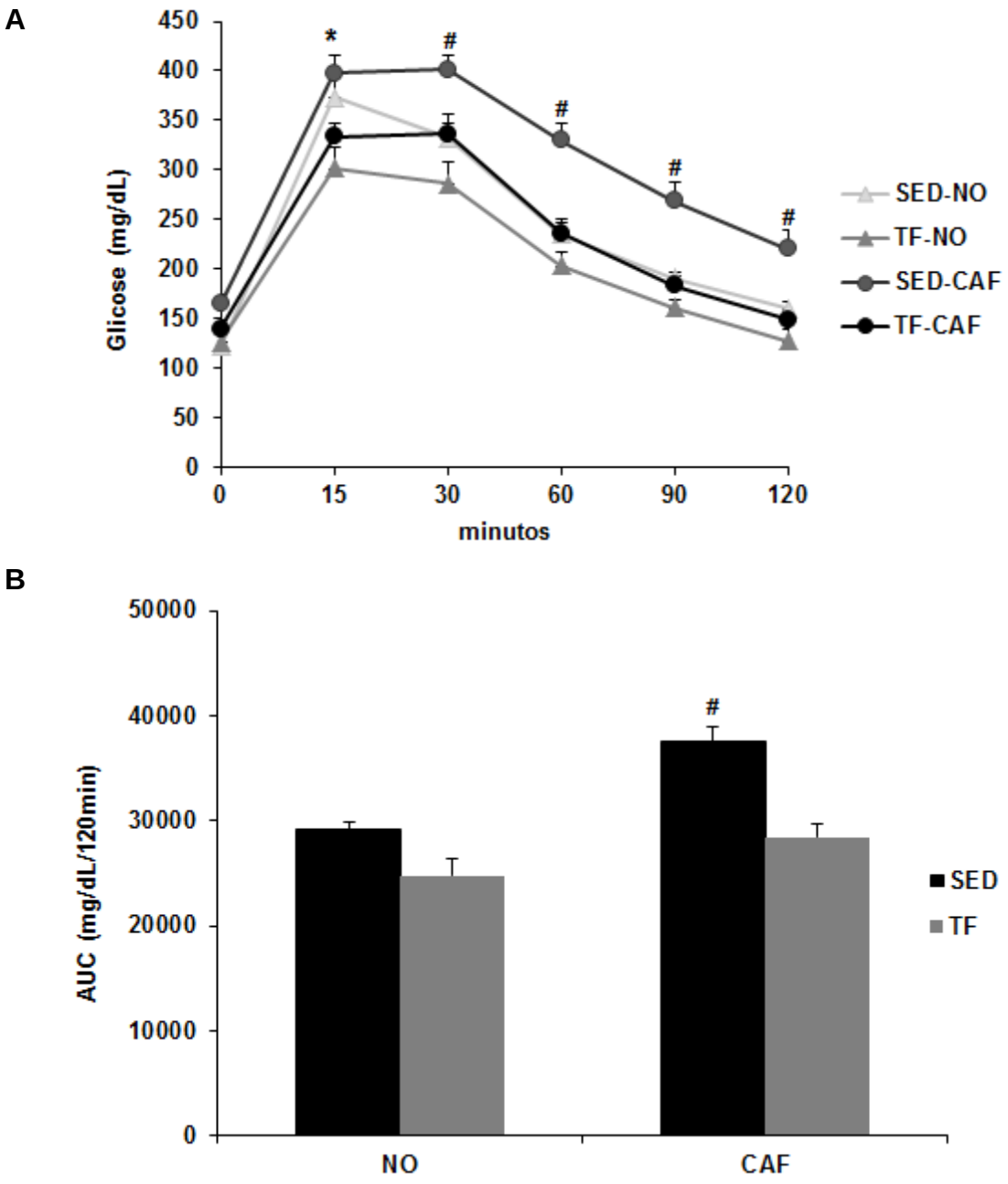


Figura 14: Curva glicêmica (A) e área sob a curva (AUC) do teste de tolerância à glicose (B). *p≤0,05 SED-NO *vs* TF-NO, #p≤0,05 SED-CAF *vs* SED-NO, TF-NO e TF-CAF (n=10/grupo).

Já no teste de tolerância à insulina, podemos observar que o grupo SED-CAF apresentou prejuízo no decaimento da glicose estimulado pela insulina, permanecendo com o nível de glicose superior aos demais grupos no final do teste (Figura 15A). O

mesmo pode ser evidenciado através do cálculo da constante de decaimento da glicose (kITT) (Figura 15B). Sendo assim, é possível evidenciar que o grupo SED-CAF apresenta resistência à ação da insulina comparado aos demais grupos e que o TFA foi capaz de prevenir esta resposta no grupo TF-CAF.

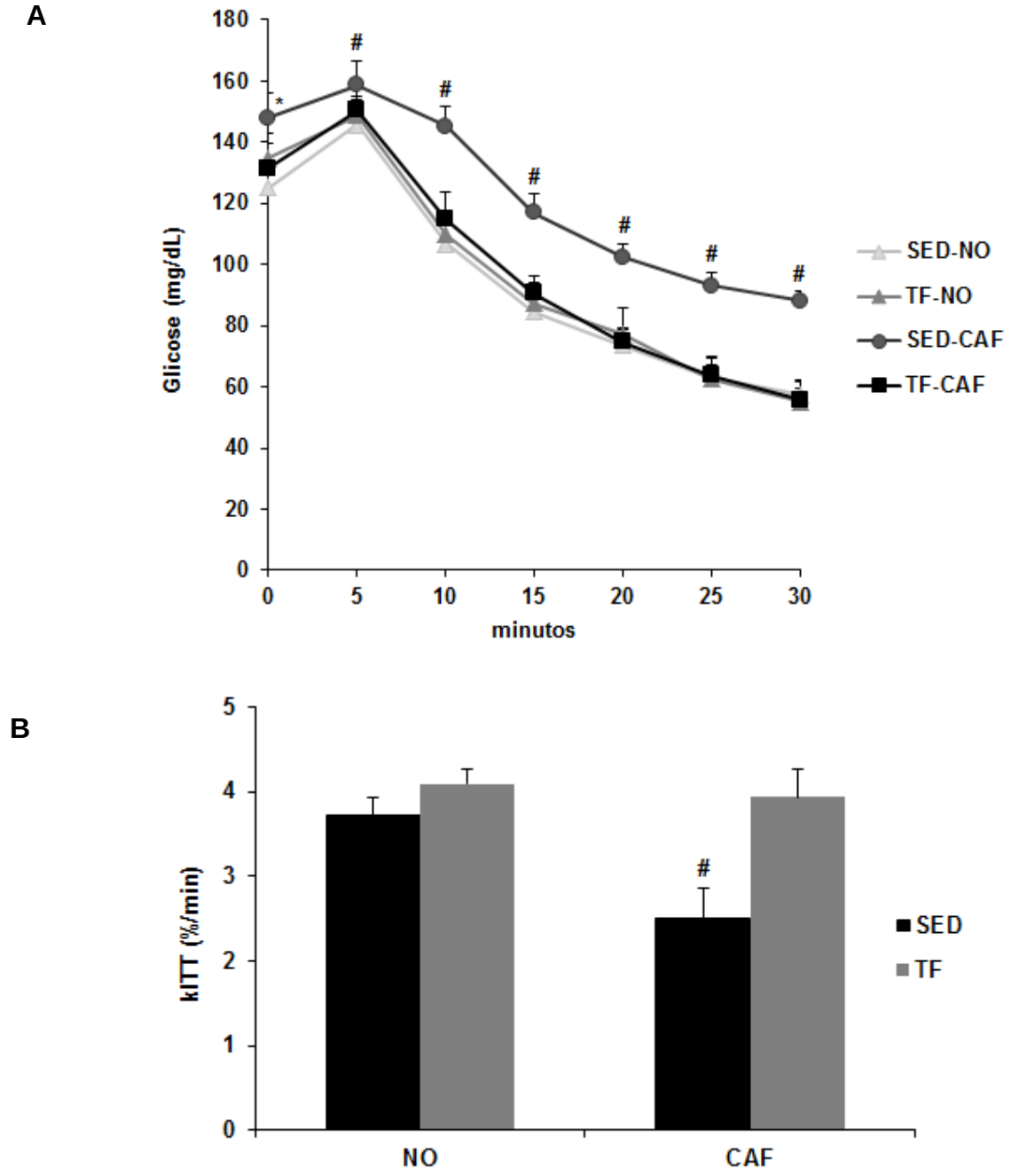


Figura 15: Curva de decaimento de glicose (A) e constante de decaimento da glicose (Kitt) (B) após a injeção de insulina. *p≤0,05 SED-CAF *vs* SED-NO, #p≤0,05 SED-CAF *vs* SED-NO, TF-NO e TF-CAF (n=10/grupo).

5.5. Respostas no TAB-PE

5.5.1 Marcadores de metabolismo tecidual

No TAB-PE, foram avaliadas proteínas responsáveis pela sinalização da insulina e captação de glicose. Não houve diferença na expressão proteica da AKT total entre os grupos (Figura 16A). Porém, pode-se observar menor expressão proteica da AKT fosforilada em todos os grupos comparado ao SED-NO (Figura 16B). Da mesma forma, a razão entre as proteínas AKT fosforilada e AKT total foi menor nos grupos TF-NO, SED-CAF e TF-CAF comparado ao SED-NO (Figura 16C). Não observamos diferença na expressão proteica do transportador de glicose GLUT-4 no TAB-PE dos grupos estudados (Figura 16D).

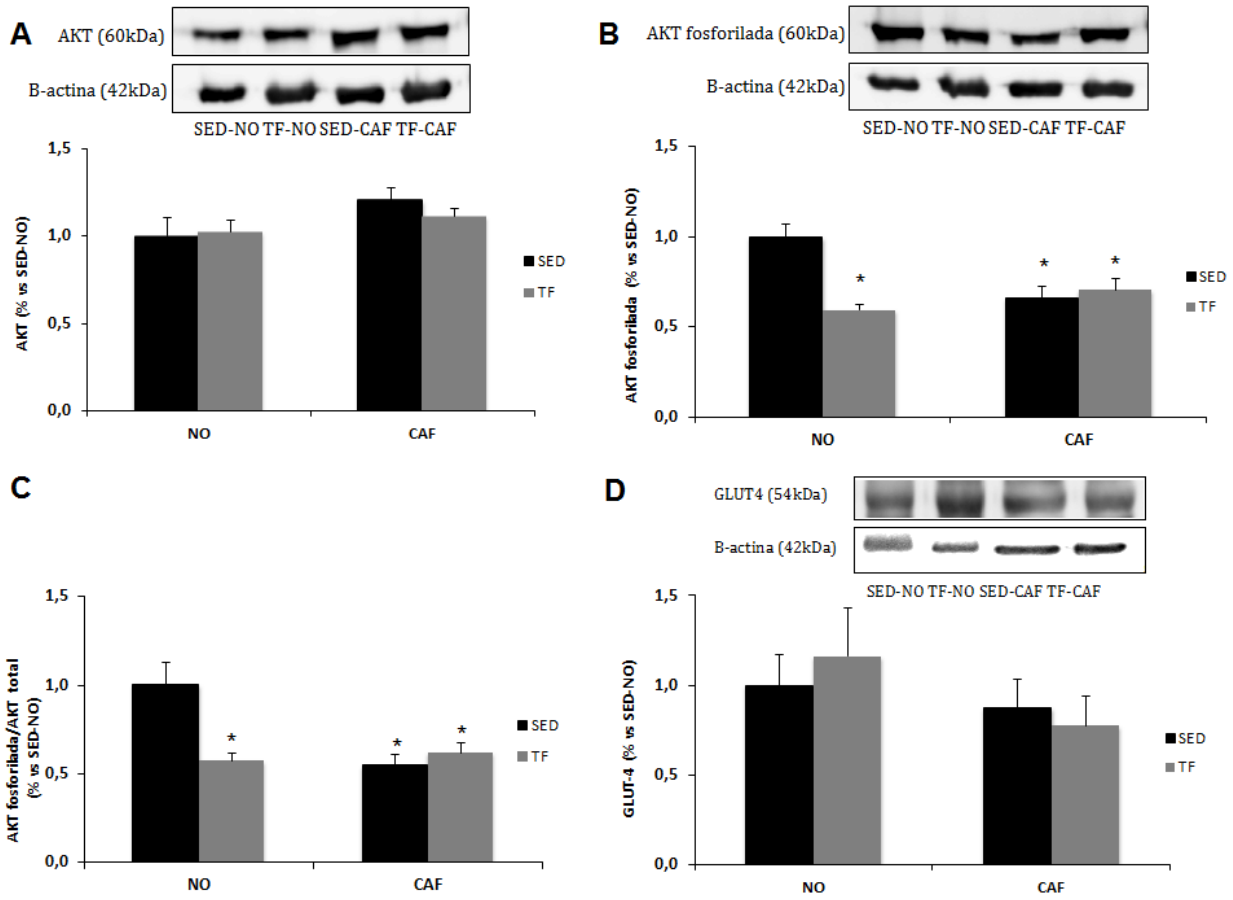


Figura 16: Expressão proteica da AKT total (A), da AKT fosforilada (B), razão AKT fosforilada/ AKT total (C) e expressão proteica do GLUT-4 (D) no TAB-PE (n= 4-5/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO.

Também foram avaliadas proteínas responsáveis pela sinalização da lipólise. Na figura 17B, pode-se observar aumento na expressão da proteína HSL fosforilada (forma ativa) em ambos os grupos que consumiram a dieta de cafeteria SED-CAF e TF-CAF comparados aos grupos SED-NO e TF-NO. Já a expressão da HSL total (Figura 17A), a razão HSL fosforilada/HSL total (Figura 17C) e perilipina (Figura 17E) não diferiram entre os grupos estudados. Os grupos SED-CAF e TF-CAF também apresentaram aumento na expressão da ATGL no TAB-PE comparados aos grupos SED-NO e TF-NO (Figura 17D).

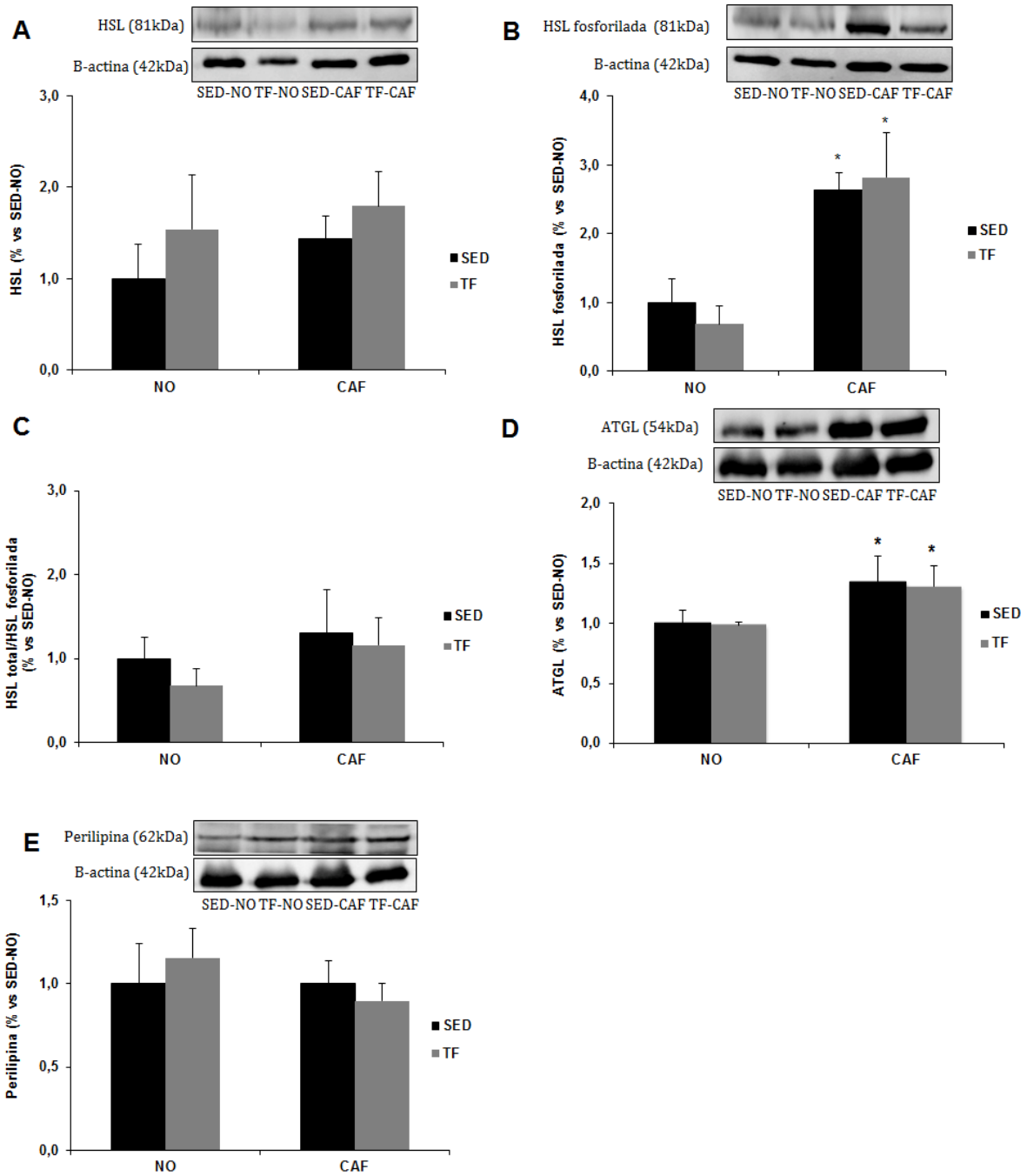


Figura 17: Expressão proteica da HSL total (A), da HSL fosforilada (B), razão HSL fosforilada/ HSL total (C), da ATGL (D) e da perilipina no TAB-PE (n= 4-6/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO e TF-NO.

5.5.2 Marcador de inflamação: citocina IL-6

No nosso modelo experimental, foi observado aumento na expressão da IL-6 nos grupos SED-CAF e TF-CAF comparados aos grupos SED-NO e TF-NO (Figura 19A).

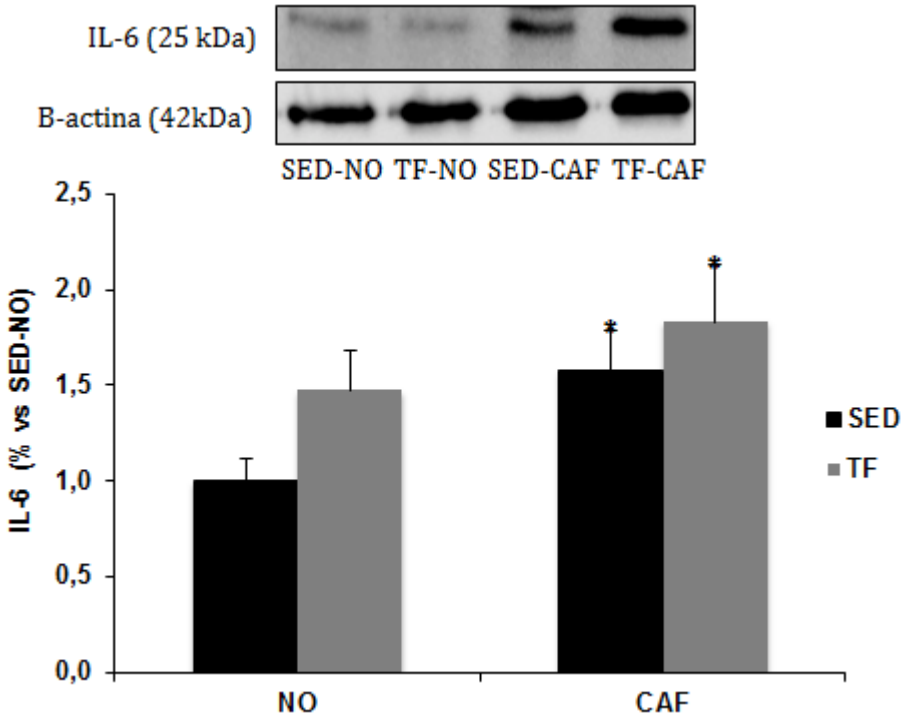


Figura 18: Expressão proteica da IL-6 (n=4/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO e TF-NO.

5.5.3 SRA

A atividade da ECA avaliada no soro não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 19). Porém, o TFA promoveu aumento na atividade da ECA2 no soro do grupo TF-NO comparado aos grupos sedentários SED-NO e SED-CAF (Figura 20). Além disso, a concentração da Ang (1-7) no soro foi maior nos grupos TF-NO e TF-CAF comparado aos grupos SED-NO e SED-CAF (Figura 21).

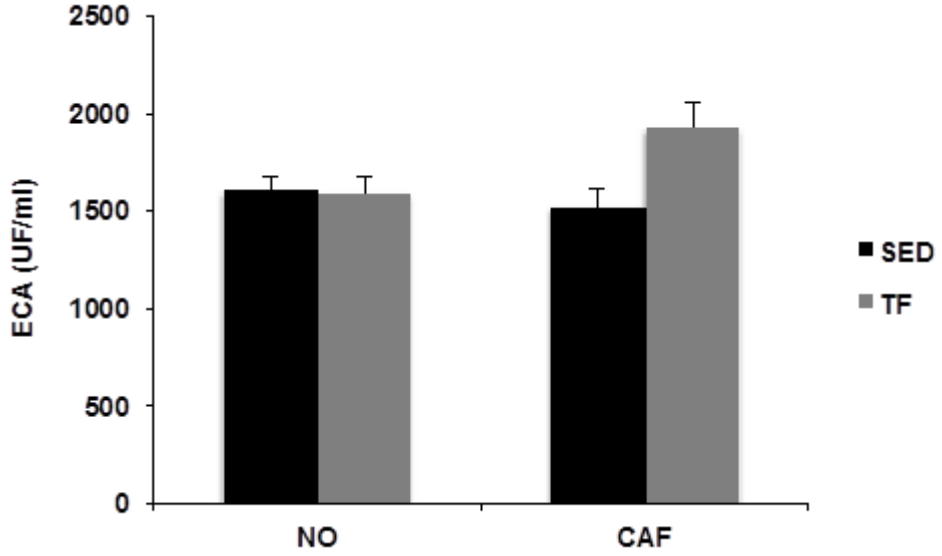


Figura 19: Atividade da ECA no soro (n=10/grupo).

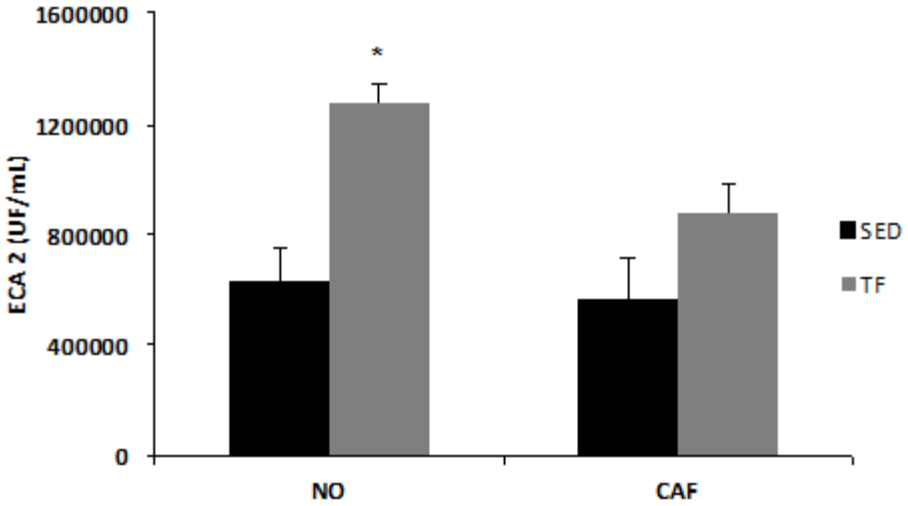


Figura 20: Atividade da ECA2 no soro (n=5/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO e SED-CAF.

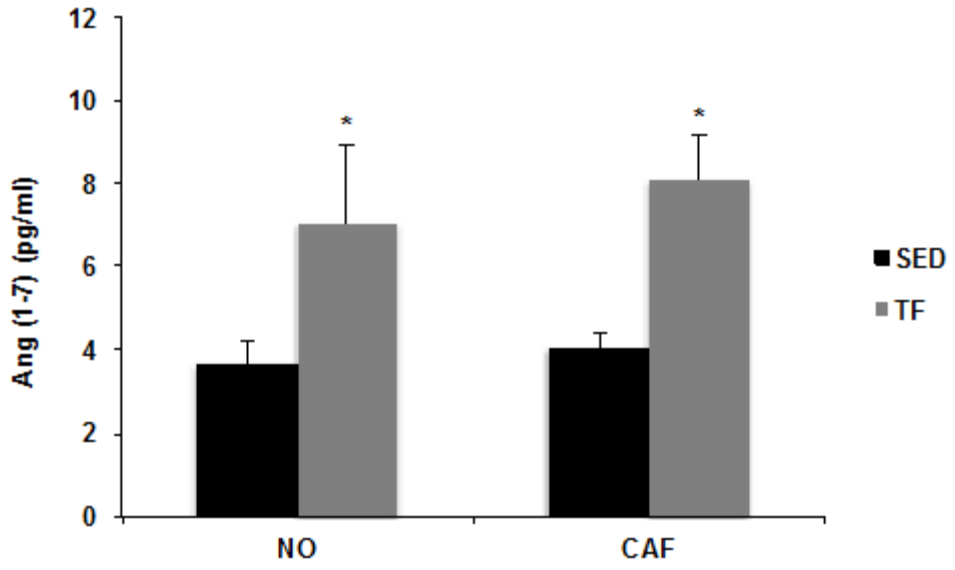


Figura 21: Concentração de Ang (1-7) no soro (n=5/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO e SED-CAF.

Nas análises de correlação executadas entre as dosagens séricas de ECA, ECA2 e Ang (1-7) e os testes glicêmicos, foi observada correlação positiva tanto entre ECA2 e AUC (r = 0,8) (Figura 22A) quanto entre ECA2 e kITT (r = 0,7) (Figura 22B). A correlação entre a Ang (1-7) sérica e AUC (Figura 22C) e entre Ang (1-7) sérica e kITT (Figura 22D) não foram diferentes estatisticamente.

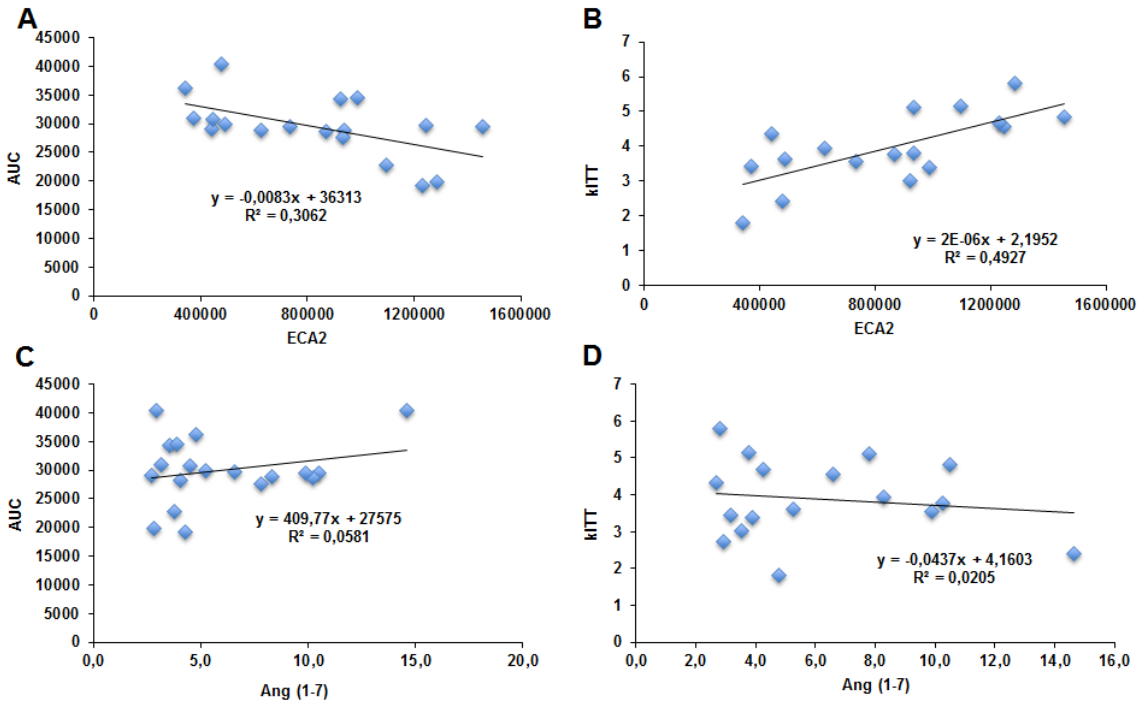


Figura 22: Correlação entre ECA2 sérica e AUC (A), entre ECA2 sérica e kITT (B), entre Ang (1-7) sérica e AUC (c) e entre Ang(1-7) sérica e kITT (n=5/grupo).

No depósito de TAB-PE, não houve diferença na expressão proteica do angiotensiogênio (Figura 23A). Da mesma forma que no soro, a atividade da ECA também não foi diferente entre os grupos (Figura 23B). Com relação ao principal peptídeo da alça clássica do SRA, a concentração da Ang II não foi diferente nesse depósito (Figura 23C). Assim como os demais componentes da via, a expressão proteica dos receptores AT1 (Figura 23D) e AT2 (Figura 23E) também não foram diferentes entre os grupos estudados. Sendo assim, tanto a dieta de cafeteria quanto o TFA não promoveram modificações na alça clássica do SRA no depósito de TAB-PE.

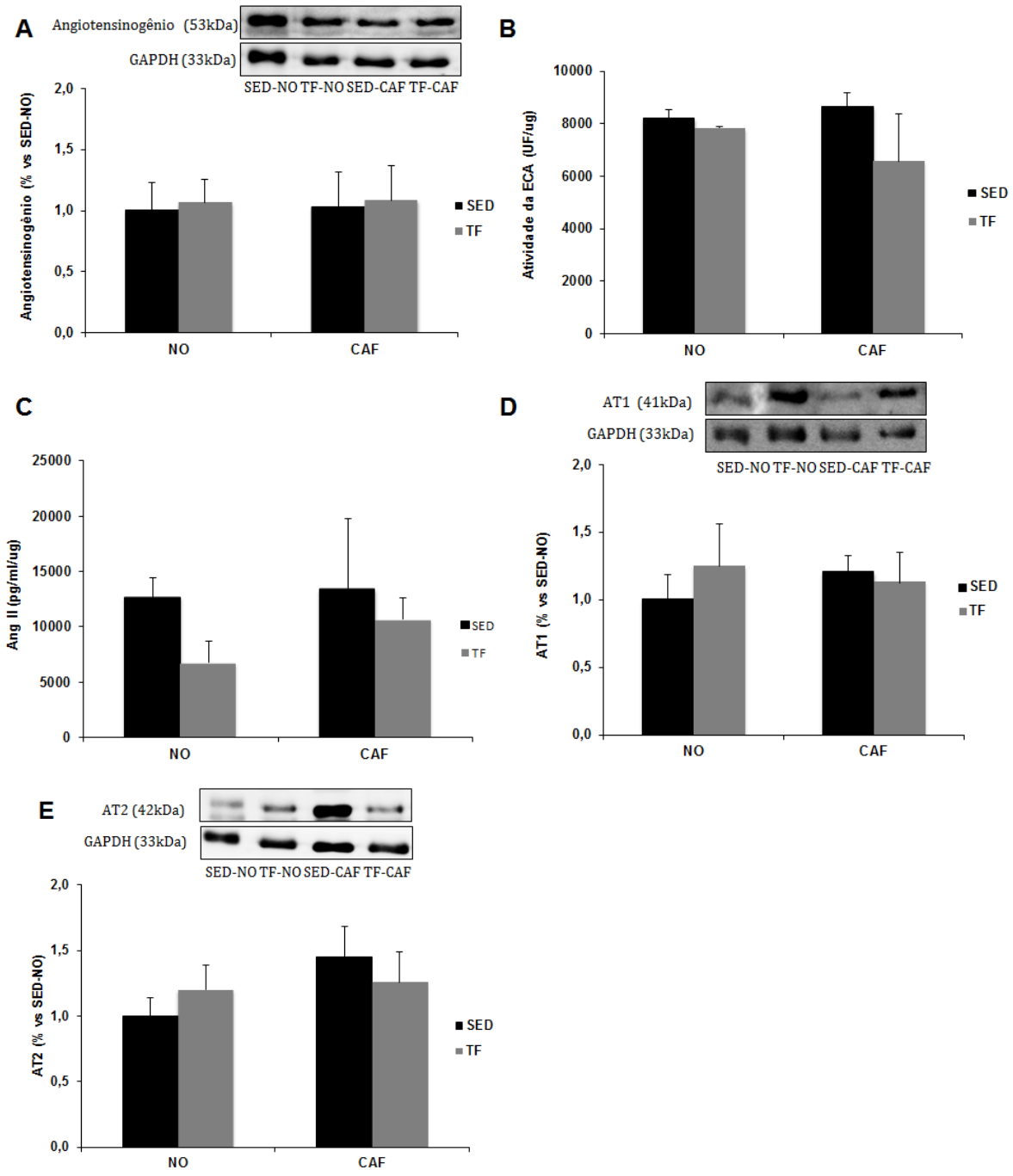


Figura 23: Expressão proteica do angiotensinogênio (A), atividade da ECA (B), concentração de Ang II (C), expressão proteica do AT1 (D) e expressão proteica do AT2 (E) no TAB-PE (n=4-5/grupo).

Na quantificação da alça não clássica do SRA no TAB-PE, observamos aumento na atividade da ECA2 em ambos os grupos que consumiram a dieta de cafeteria. Além disso, o grupo SED-CAF apresentou diferença estatística comparado aos grupos SED-NO e TF-NO, porém, o grupo TF-CAF foi diferente somente comparado ao grupo TF-NO (Figura 24A). No TAB-PE, não observamos diferença no conteúdo de Ang (1-7) (Figura 24B) e na expressão do receptor MAS (Figura 24C) entre os grupos estudados.

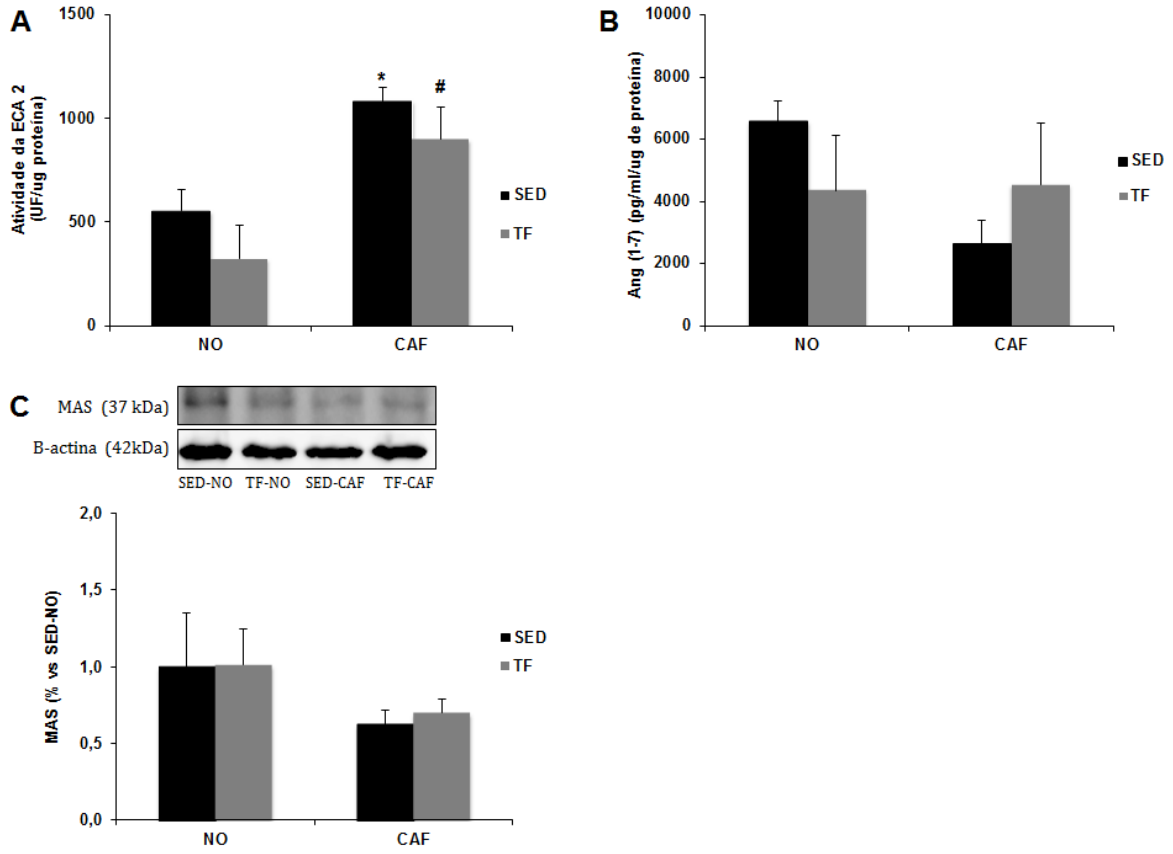


Figura 24: Atividade da ECA2 (A), concentração de Ang (1-7) (B) e expressão proteica do receptor Mas (C) no TAB-PE (n=4-5/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO e TF-NO; #p<0,05 *vs* TF-NO.

Quando calculamos a razão entre as atividades da ECA2/ECA no TAB-PE, observamos aumento em ambos os grupos alimentados com a dieta de cafeteria comparado aos grupos SED-NO e TF-NO (Figura 25A). Já para a razão entre os

peptídeos Ang(1-7)/AngII, mesmo sem diferença nas concentrações de ambos os peptídeos isolados, o TFA foi capaz de aumentar a razão no grupo TF-NO comparado aos grupos SED-NO e TF-CAF. No entanto, a dieta de cafeteria impediu essa resposta no TF-CAF (Figura 25B). Por fim, não foram observadas diferenças estatísticas no cálculo das correlações entre a razão Ang (1-7)/Ang II e os parâmetros de tolerância a glicose (Figura 26A) e sensibilidade à insulina (Figura 26B).

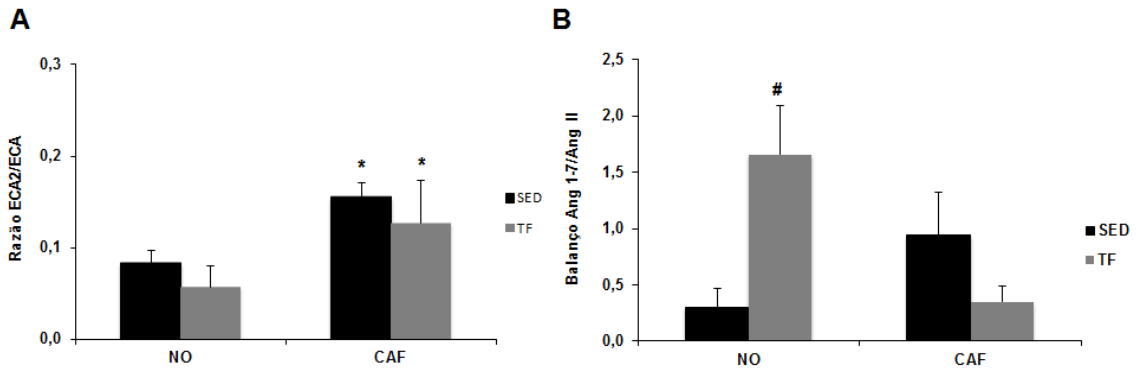


Figura 25: Razão da atividade da ECA2/ECA (A) e razão das concentrações de Ang (1-7)/Ang II (B) no TAB-PE (n=5/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO e TF-NO; #p<0,05 *vs* SED-NO e TF-CAF.

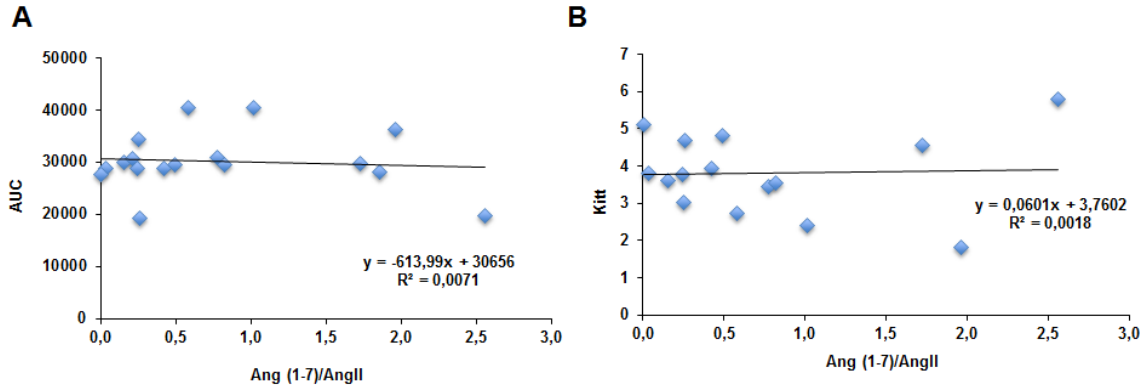


Figura 26: Correlação entre a razão dos peptídeos Ang (1-7)/Ang II e a área sob a curva da glicose (A). Correlação entre a razão dos peptídeos Ang (1-7)/Ang II e a constante de decaimento da insulina (B) no TAB-PE (n=5/grupo).

5.6 Resposta no TAB-SC

5.6.1 Marcadores de metabolismo tecidual

No depósito de TAB-SC, para as proteínas relacionadas com o metabolismo de glicose, não observamos diferença na expressão proteica da AKT total (Figura 27A) e da AKT fosforilada (Figura 27B), porém houve redução na razão entre a AKT fosforilada e a AKT total em ambos os grupos treinados comparados ao SED-NO (Figura 27C). No TAB-SC, também não foi observada diferença na expressão proteica do transportador de glicose GLUT-4 (Figura 27D).

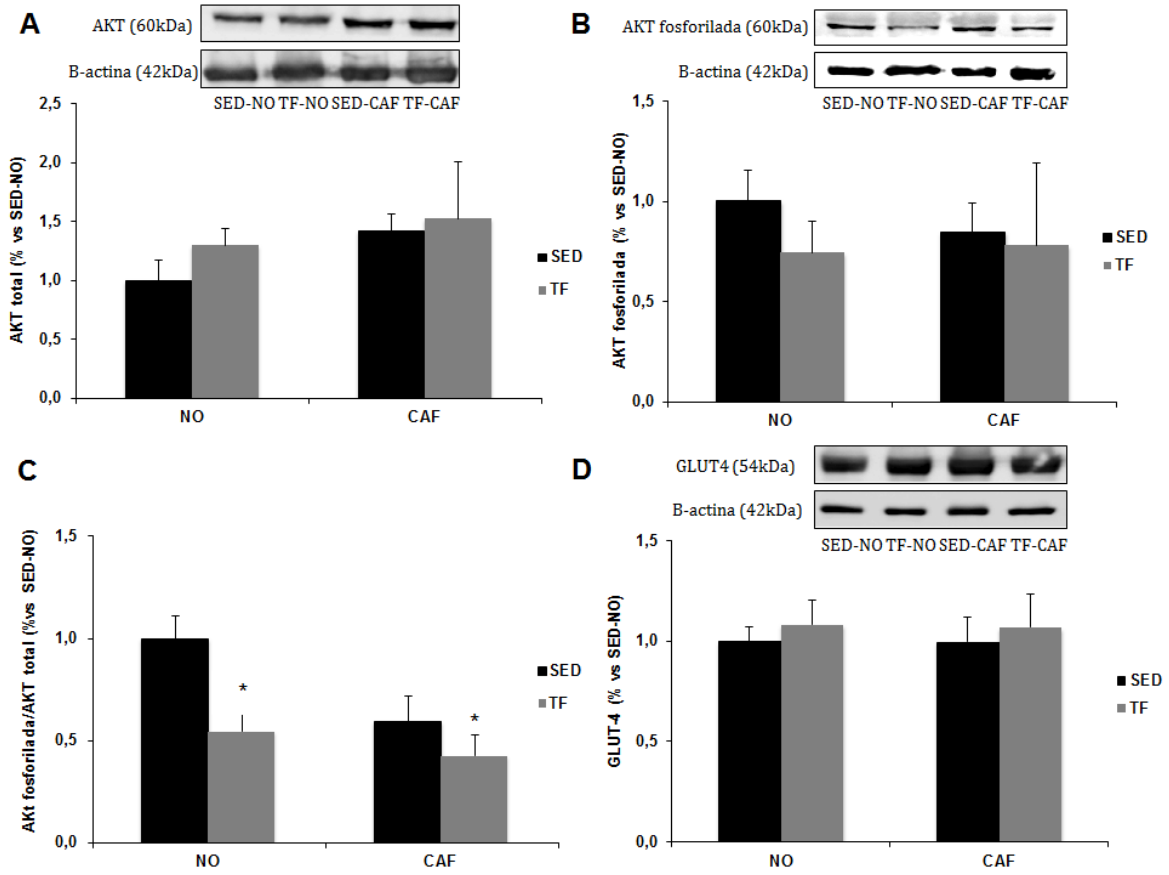


Figura 27: Expressão proteica da AKT total (A), da AKT fosforilada (B), razão AKT fosforilada/AKT total (C) e expressão proteica do GLUT-4 (D) no TAB-SC (n= 4/grupo).*p<0,05 *vs* SED-NO.

No TAB-SC, também avaliamos a expressão da proteína AMPK. A ativação da AMPK via fosforilação tem um papel importante para a captação de glicose independente da sinalização da insulina. Porém, não observamos diferença na expressão da AMPK total (Figura 28A), da AMPK fosforilada (Figura 28B) e da razão entre a AMPK fosforilada e a AMPK total (Figura 28C).

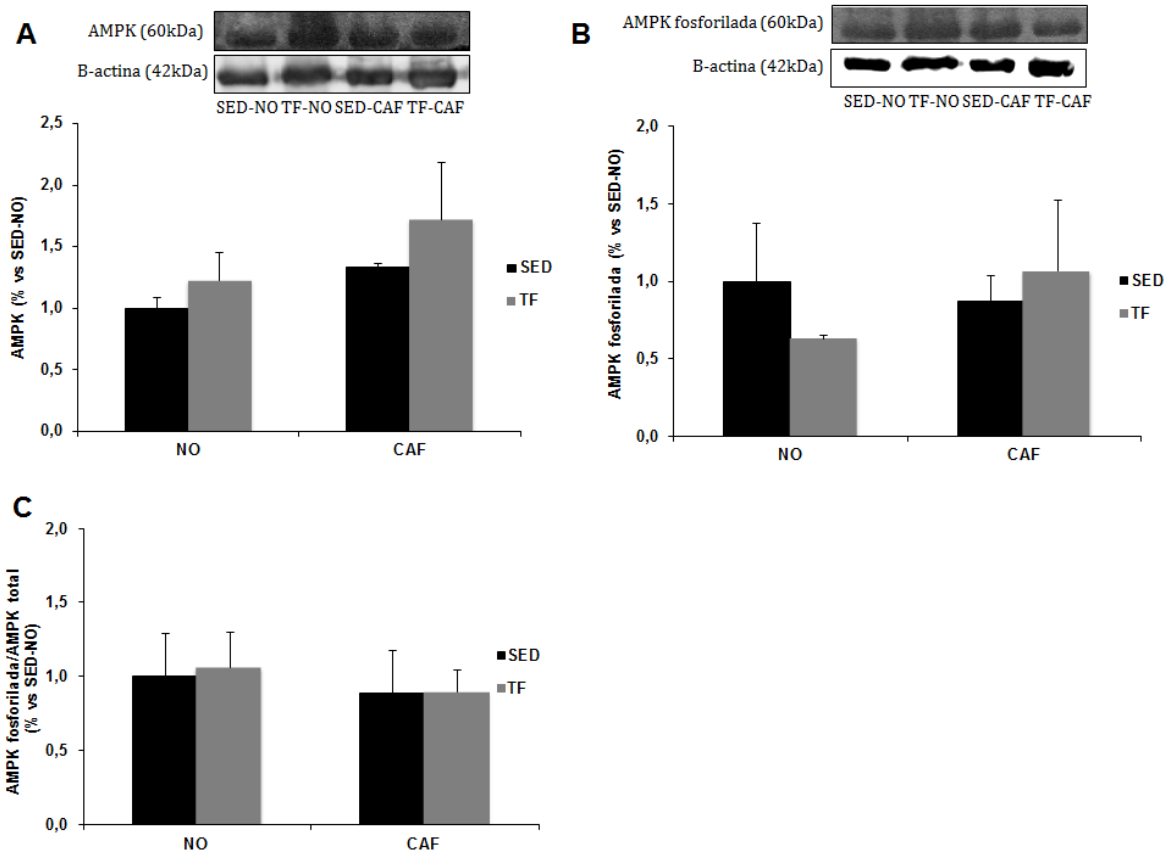


Figura 28: Expressão proteica da AMPK total (A), da AMPK fosforilada (B) e razão AMPK fosforilada/ AMPK total (C) no TAB-SC (n= 4/grupo).

A expressão proteica da HSL total no TAB-SC foi maior no grupo TF-CAF comparado ao grupo TF-NO (Figura 29A). Não observamos diferença na HSL fosforilada neste depósito (Figura 29B), porém a razão entre a HSL fosforilada e a HSL total foi maior no grupo TF-CAF comparado aos grupos TF-NO e SED-CAF (Figura 29C). Também houve aumento da expressão da ATGL em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria comparado aos grupos SED-NO e TF-NO. Não

observamos diferença na expressão proteica da perilipina entre os grupos estudados (Figura 29D).

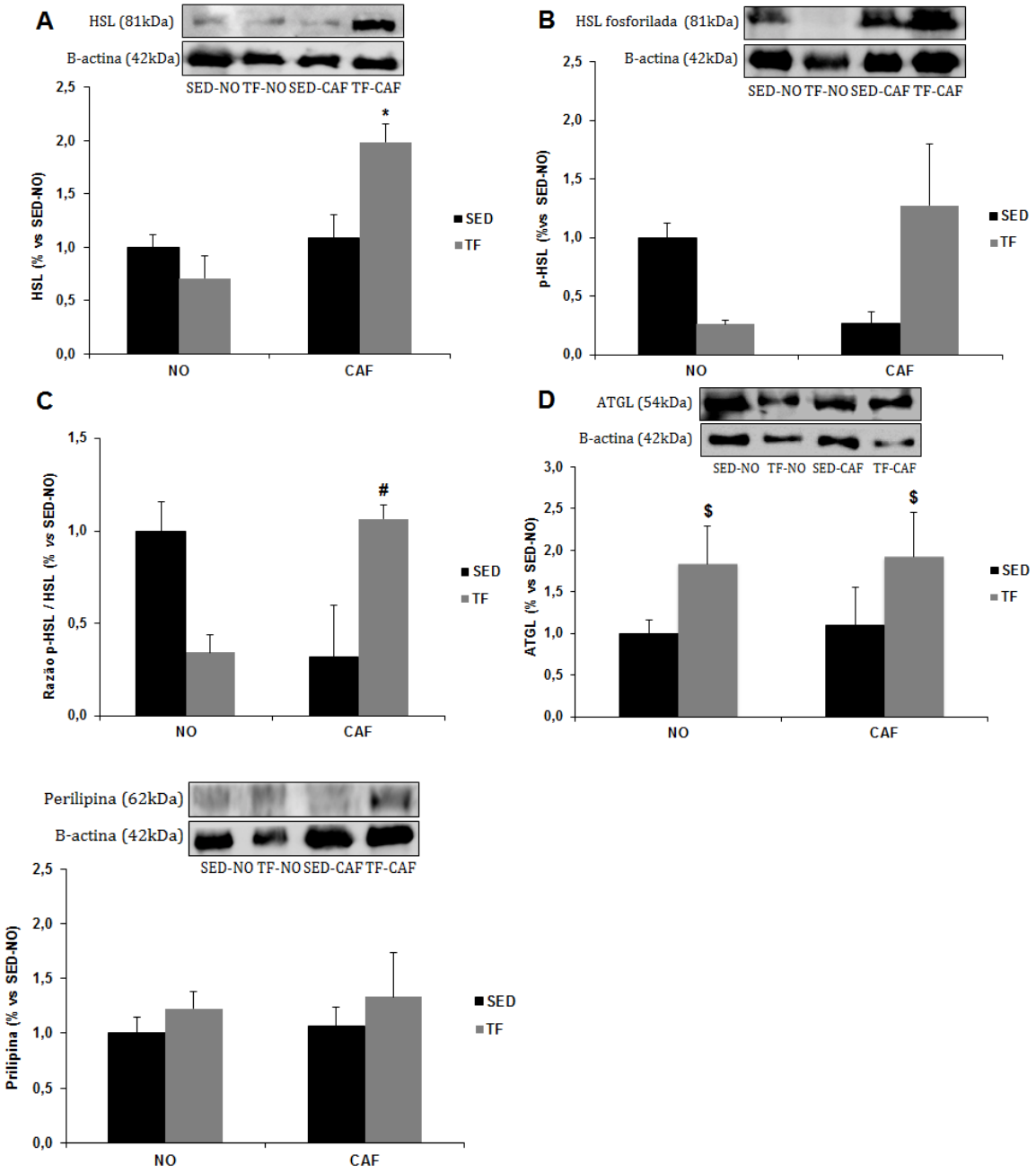


Figura 29: Expressão proteica da HSL total (A), da HSL fosforilada (B), razão HSL fosforilada/ HSL total (C), expressão proteica da ATGL (D) e da perilipina no TAB-SC (n= 4-6/grupo).*p<0,05 *vs* TF-NO; #p<0,05 *vs* TF-NO e SED-CAF; $p<0,05 *vs* SED-NO e SED-CAF.

5.6.2 Morfometria

Análises qualitativas de cortes histológicos de TAB-SC corados com hematoxilina e eosina revelaram a presença de adipócitos hipertrofiados no grupo SED-CAF comparado aos demais grupos (Figura 30A). Esse resultado é corroborado pelas as análises quantitativas de diâmetro (Figura 30B) e área (Figura 30C) dos adipócitos realizadas nos mesmos cortes histológicos de TAB-SC, nos quais observou-se aumento no grupo SED-CAF em ambos os parâmetros avaliados comparados aos grupos SED-NO, TF-NO e TF-CAF. Esse resultado mostra que a dieta causou hipertrofia nos adipócitos e que o TFA foi capaz de impedir esse efeito no grupo TF-CAF.

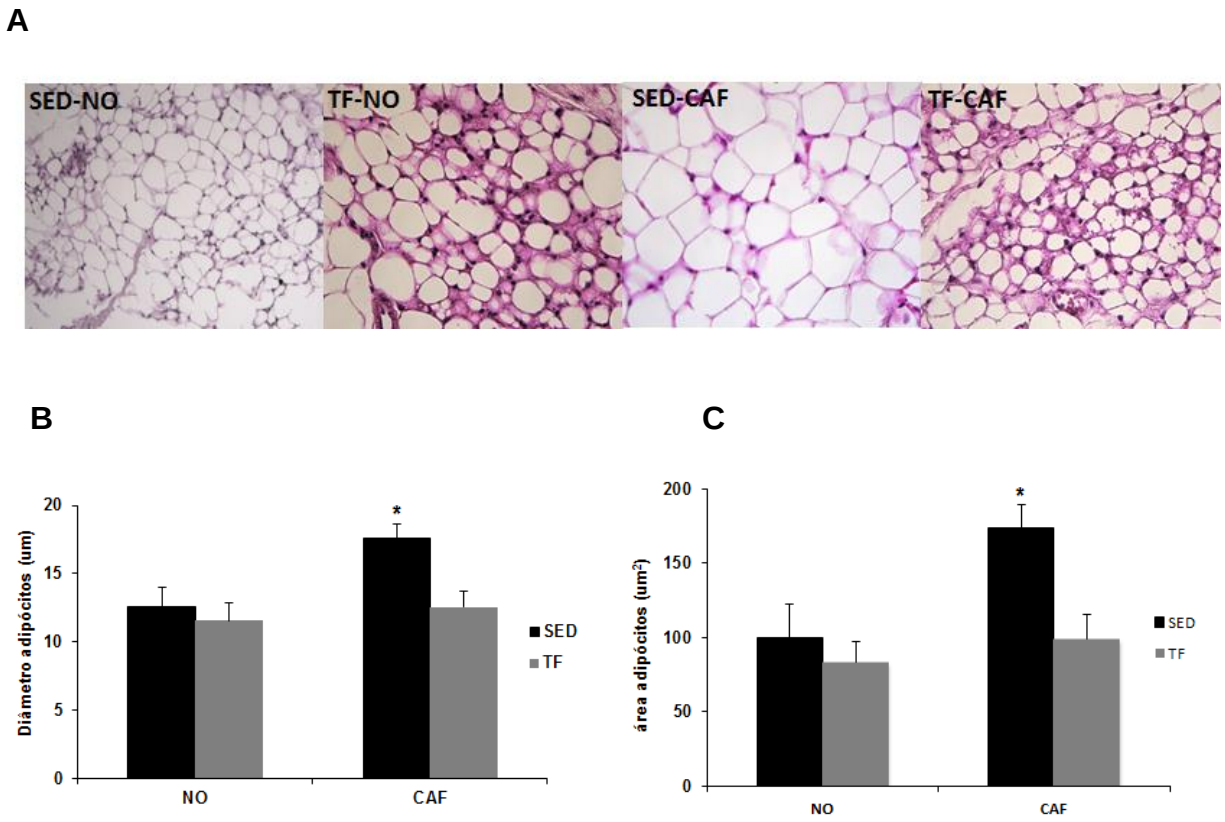


Figura 30: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de TAB-SC corados com hematoxilina e eosina para a visualização da morfologia dos adipócitos no aumento de 400X (A). Diâmetro dos adipócitos em µm (B) e área dos adipócitos em μm^2 (C). *p<0,05 *vs* SED-NO. TF-NO e TF-CAF (n=10/grupo).

5.6.3 Marcadores de termogênese/*browning*: mRNA e UCP1

Com relação a expressão de genes relacionados com termogênese e processo de *browning*, houve aumento não significativo de 116% na expressão da UCP-1 no grupo TF-NO comparado ao grupo SED-NO. Além disso, observamos redução não significativa de 87% na expressão da UCP-1 no grupo SED-CAF comparado ao grupo SED-NO. A expressão da UCP-2 foi menor no grupo SED-CAF comparado aos grupos SED-NO e TF-NO. Já para o fator de fragmentação de DNA indutor de morte celular (CIDEA), foi possível observar redução na expressão do gene em ambos os grupos de dieta de cafeteria comparados ao grupo TF-NO (Tabela 4).

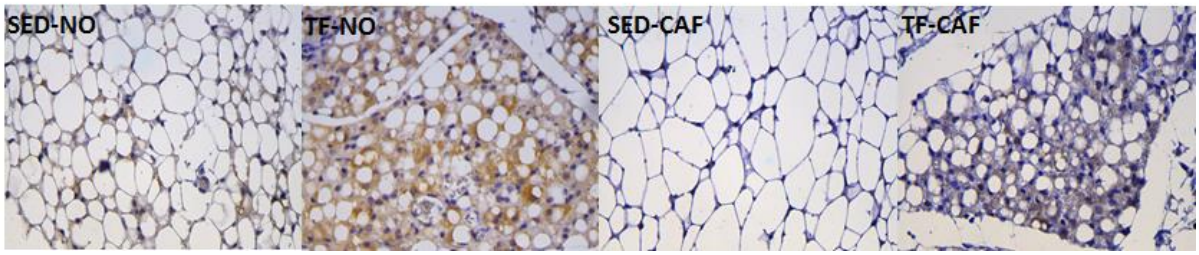
Tabela 4: Expressão de mRNA no TAB-SC

Genes	SED-NO (n=5)	TF-NO (n=5)	SED-CAF (n=4)	TF-CAF (n=5)
UCP-1 (UA)	1,0 ± 0,19	2,16 ± 0,91	0,13 ± 0,04	1,26 ± 0,9
UCP-2 (UA)	1,0 ± 0,04	1,02 ± 0,08	0,47 ± 0,09*	0,71 ± 0,2
CIDEA (UA)	1,0 ± 0,24	2,1 ± 0,21	0,23 ± 0,06#	0,81 ± 0,42#

Cada valor representa o valor médio da expressão gênica. UA= unidades arbitrárias. *p≤ 0,05 *vs* SED-NO e TF-NO; # p≤ 0,05 *vs* TF-NO.

No presente modelo experimental, o TFA promoveu aumento na expressão de UCP-1 no TAB-SC do grupo TF-NO comparado aos demais grupos, o que sugere o aumento da capacidade termogênica do tecido que pode ser derivada do *browning*. De maneira interessante, o TFA combinado com a dieta de cafeteria amenizou essa resposta no grupo TF-CAF (Figura 31 A e B).

A



B

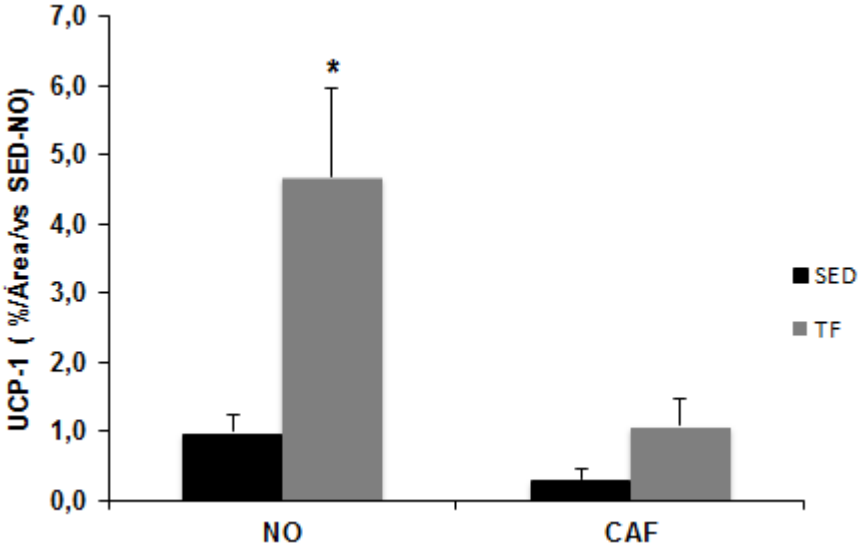


Figura 31: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de TAB-SC com marcação para UCP-1 (marcação positiva em marrom) no aumento de 400X (A). Conteúdo de UCP-1 no TAB-SC (B) (n=5/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO, TF-NO e TF-CAF.

5.6.4 SRA

A avaliação da alça clássica do SRA no depósito de TAB-SC revelou que o TFA reduziu o conteúdo de angiotensinogênio no grupo TF-NO comparado aos grupos SED-NO e TF-CAF (Figura 32A). Não observamos diferença tanto na atividade da ECA (Figura 32B) quanto no conteúdo de Ang II (Figura 32C) entre grupos estudados nesse depósito de TAB. Porém, a expressão de ambos os receptores foi maior no grupo TF-CAF, sendo que para o receptor AT1 a diferença foi comparada aos grupos SED-NO e TF- NO (Figura 32D), e para o receptor AT2,–foi comparada a ambos os grupos sedentários SED-NO e SED-CAF (Figura 32E).

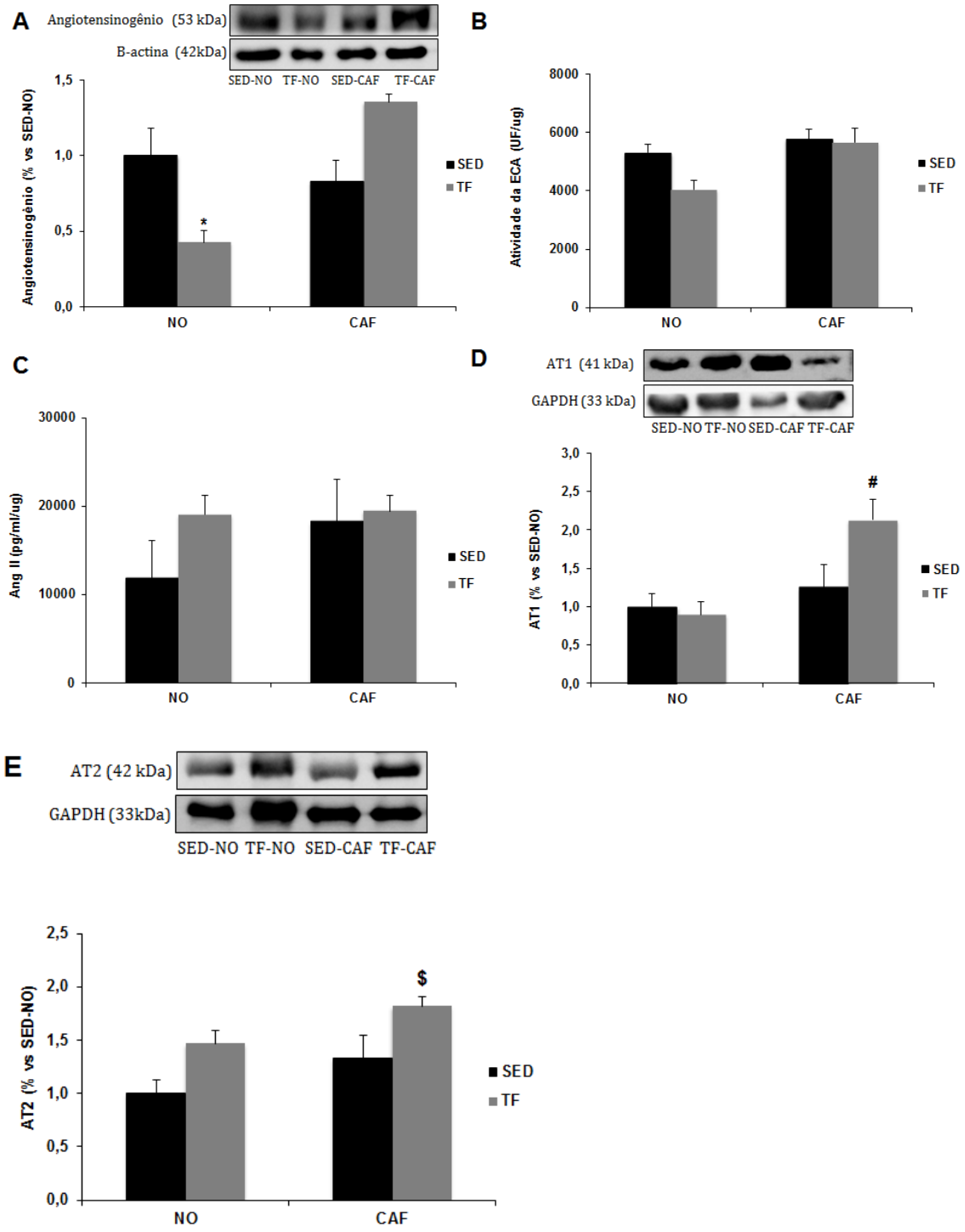


Figura 32: Expressão proteica do angiotensinogênio (A), atividade da ECA (B), concentração de Ang II (C), expressão proteica do AT1 (D), expressão proteica do AT2 (E). Quantificações realizadas no TAB-SC (n=3-8/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO e TF-CAF; $^{\#}$p<0,05 *vs* SED-NO e TF-NO; $^{\$}$p<0,05 *vs* SED-NO e SED-CAF.

Já na quantificação da alça não clássica do SRA no depósito de TAB-SC, observamos aumento na atividade da ECA2 em ambos os grupos que consumiram a dieta de cafeteria comparado aos dois grupos de dieta normocalórica (Figura 33A). Diferente da resposta encontrada no depósito TAB-PE, o TFA foi capaz de aumentar os níveis da Ang (1-7) no grupo TF-NO comparado aos demais grupos no TAB-SC, sendo que, a dieta de cafeteria impediu essa resposta no grupo TF-CAF (Figura 33B). Já para a quantificação proteica do receptor MAS, observamos aumento da expressão no grupo TF-CAF quando comparado ao grupo TF-NO (Figura 33C).

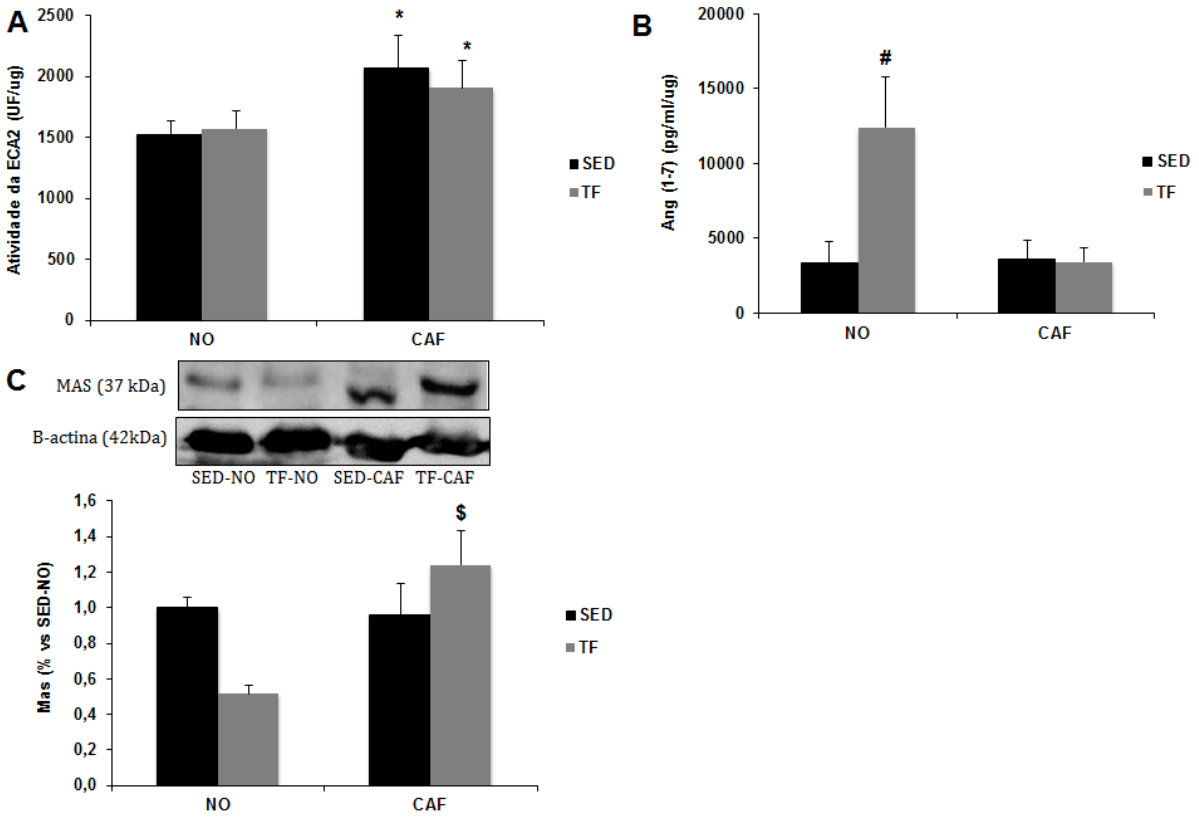


Figura 33: Atividade da ECA2 (A), concentração de Ang (1-7) (B) e expressão proteica do receptor MAS (C) no TAB-SC (n=5-9/grupo). *p<0,05 *vs* SED-NO e TF-NO; #p<0,05 *vs* SED-NO, TF-NO e TF-CAF; $p<0,05 *vs* TF-NO.

Para o depósito de TAB-SC, a razão entre as atividades da ECA2/ECA não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 34A). O TFA foi capaz de aumentar a razão Ang (1-7)/AngII no grupo TF-NO comparado aos grupos alimentados com a dieta

de cafeteria SED-CAF e TF-CAF, mostrando também que a dieta de cafeteria impediu a resposta induzida pelo TFA no grupo TF-CAF (Figura 34B).

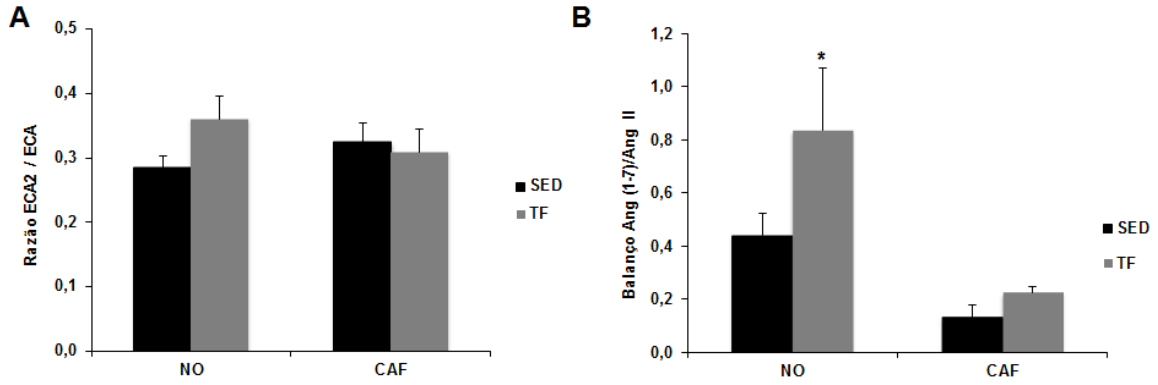


Figura 34: Razão da atividade da ECA2/ECA (A) e razão dos peptídeos Ang (1-7)/Ang II (B) no TAB-SC (n=5/grupo). *p<0,05 *vs* SED-CAF e TF-CAF.

Observamos correlação positiva entre UCP-1 e Kitt (r = 0,6) (Figura 35A), UCP-1 e Ang (1-7) (r = 0,6) (Figura 35B) e UCP-1 e a razão Ang (1-7) / Ang II (r = 0,7) (Figura 35C). A correlação entre a UCP-1 e a Ang II não foi diferente estatisticamente (Figura 35D).

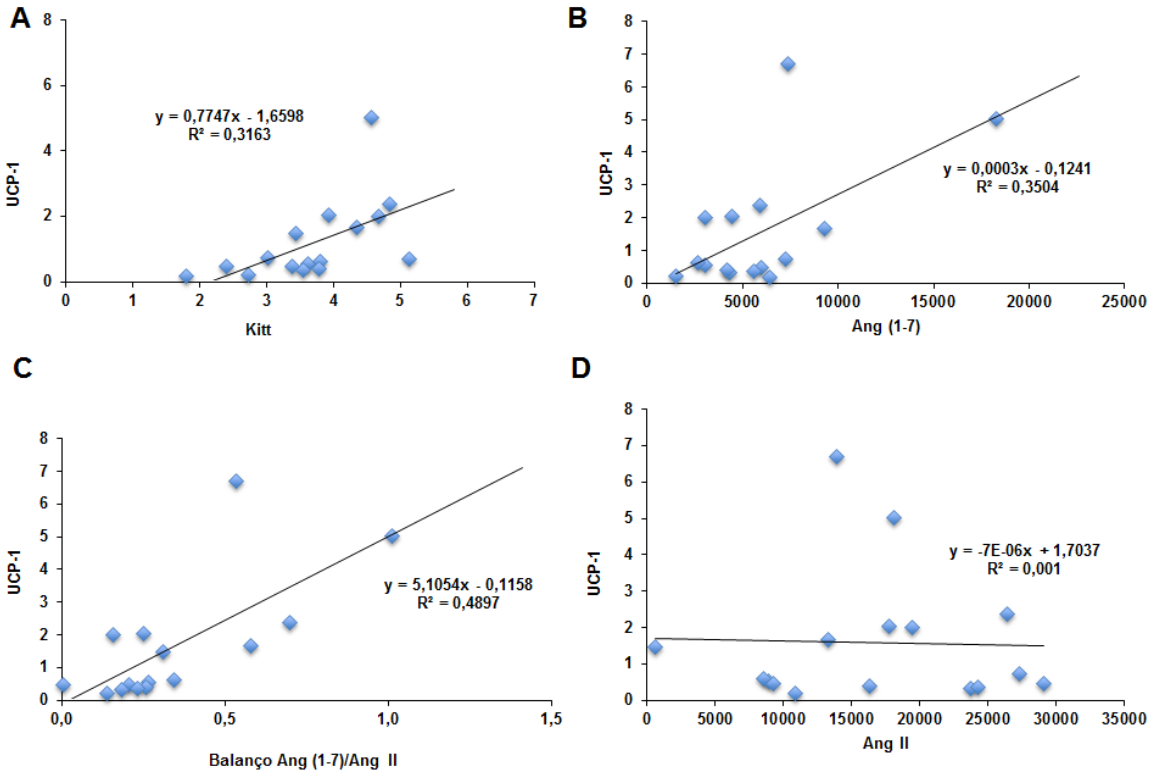


Figura 35: Correlação entre UCP-1 e Kitt (A), UCP-1 e Ang (1-7) (B), UCP-1 e razão de Ang (1-7) / Ang2 (C) e, UCP-1 e Ang II (D) no TAB-SC (n=5/grupo).

6. Discussão

O presente trabalho propôs avaliar se o efeito protetor do TFA contra a obesidade e a RI estava associado com a modulação das duas alças do SRA no TAB: ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang (1-7)/Mas. Além disso, foi avaliado se as respostas do SRA estavam associadas com modificações em parâmetros metabólicos e efeito *browning* do TAB.

Conforme os resultados de desempenho físico no teste de esforço físico máximo após o TFA, foi possível observar a adaptação favorável ao TFA em ambos os grupos treinados. Assim, a eficácia do protocolo de TFA utilizado neste trabalho para a promoção de adaptações aeróbias foi confirmada, como demonstrado anteriormente por MULLER *et al*. (2018), HIGA *et al*. (2014) e FERREIRA *et al*. (2007). Já é conhecido na literatura que a melhora no desempenho físico dos animais treinados, observado tanto pelo aumento da velocidade de corrida quanto pelo aumento de VO_2 máximo, estabelece uma relação direta entre a melhora da capacidade aeróbia e a redução do risco de doenças cardiovasculares e metabólicas (HOYDAL *et al*., 2007; NETO & FARINATTI, 2003).

A investigação de mecanismos relacionados com o desenvolvimento e a progressão das doenças metabólicas tem sido cada vez mais elucidada na literatura, principalmente em função do aumento da prevalência dessas doenças na população e as comorbidades associadas. Para isso, dietas ricas em sacarose, dextrose, frutose, lipídios ou combinadas, são utilizadas para a indução de modelos experimentais com elevado ganho de peso e adiposidade corporal, RI e DM2 (HARIRI *et al*., 2010; CUNHA *et al*., 2007; RONCON-ALBUQUERQUE *et al*., 2008). No presente estudo, foi utilizada a dieta de cafeteria desenvolvida pelo nosso grupo, a qual foi mais eficaz para induzir adiposidade, hipertrofia de adipócitos, hiperglicemia, intolerância à glicose e resistência precoce à insulina, quando comparada à dieta hiperlipídica (HIGA *et al.* 2014). Os resultados corroboraram o estudo de Sampey *et al*. (2011), no qual foi demonstrado que a dieta de cafeteria provocou prejuízos metabólicos mais robustos que a dieta rica em gordura em ratos. Dessa forma, o modelo experimental utilizado neste estudo foi adequado para a investigação dos objetivos propostos.

O consumo de ração ao longo do protocolo experimental não diferiu entre os grupos estudados. É sabido que a melhora na palatabilidade das dietas de cafeteria pode levar ao desenvolvimento de hiperfagia no animal (HEYNE *et al*., 2009). No entanto, isso não ocorreu nos grupos alimentados com dieta de cafeteria SED-CAF e TF-CAF. Uma possível explicação para esse resultado é que o consumo de alimentos desencadeia sinais neurais e hormonais, originários da periferia, que interagem com o sistema nervoso central regulando a ingestão de alimentos, de acordo com as necessidades energéticas. Assim, a necessidade energética do animal pode ser suprida através da ingestão de menor quantidade de ração com maior densidade calórica. Além disso, em resposta à composição de macronutrientes presentes na dieta, ocorre a liberação de hormônios gastrointestinais, pancreáticos e derivados do TAB, que contribuem para a sinalização de saciedade no hipotálamo. Sendo assim, esse poderoso sistema de *feedback* é sensível à composição de macronutrientes da dieta e, portanto, pode contribuir para o controle da ingestão alimentar (BELLISSIMO & AKHAVAN, 2015).

Além do tipo de dieta, o efeito do TFA também pode interferir na ingestão alimentar, principalmente em função do gasto energético (D'ANGELO *et al*., 2010). Estudos prévios do nosso grupo mostraram aumento significativo na ingestão alimentar de animais treinados com natação (HIGA et al., 2012; MAZZUCATTO et al., 2014). No entanto, quando realizamos estudos com animais treinados com corrida na esteira, a ingestão alimentar não foi diferente entre os grupos treinado e sedentário (HIGA *et al*., 2014; MULLER *et al*., 2018). Interessante que, os dados do presente trabalho confirmam nossos achados prévios com corrida e de outros autores que não mostram diferença no consumo alimentar ou calórico de animais alimentados com dieta controle ou de cafeteria submetidos ao TFA (BRANDT *et al*, 2010; EGUCHI *et al,* 2008). Dessa forma, é plausível que diferentes metodologias como tipos de dietas, tipo de treinamento físico, duração e intensidade, possam modular a ingestão alimentar, e por isso, justificar os resultados contraditórios observados na literatura (EGUCHI et al., 2008).

A dieta de cafeteria induziu maior ganho de peso corporal e adiposidade nos animais do grupo SED-CAF. Quando se trata dos efeitos da composição da dieta no

peso ou composição corporal, não necessariamente “uma caloria é uma caloria” (HALL & GUO, 2017). Dietas isocalóricas que diferem na composição de macronutrientes podem resultar no armazenamento preferencial de energia em direção ao TAB. Enquanto dietas com alto teor proteico parecem oferecer vantagens em relação à composição corporal, os efeitos de carboidratos e gordura na dieta são debatidos. Dietas ricas em carboidratos elevam a secreção de insulina, favorecendo a captação de glicose pelo TAB. Por outro lado, a gordura presente na dieta não estimula a secreção de insulina. Sendo assim, dietas isocalóricas com menor teor de carboidratos e maior teor de gordura, reduzem a secreção de insulina, tornando os AG livres disponíveis para uso por tecidos metabolicamente ativos (HALL & GUO, 2017).

Da mesma maneira que o aumento no peso dos depósitos de TAB, os animais SED-CAF também apresentaram maior peso tanto do depósito de TAB-PE, corroborando com o dado demostrado anteriormente por Higa *et al*. (2014), quanto do TAB-SC. Esse aumento da massa adiposa contribui para o desenvolvimento de RI, pois o TAB além de ser considerado o principal reservatório energético, também atua como órgão endócrino secretando inúmeras adipocinas. A hipertrofia dos adipócitos os torna metabolicamente disfuncionais, causando o aumento da síntese de leptina e de citocinas pró-inflamatórias e a redução da adiponectina, levando a prejuízos na via de sinalização da insulina (SCHOETTL *et al*., 2018; HAMMARSTEDT *et al*., 2012; SMITH & KAHN, 2016). De fato, os animais SED-CAF do presente estudo apresentaram intolerância à glicose e RI. Nós já havíamos demonstrado anteriormente que os animais SED-CAF apresentam intolerância à glicose e RI, além de maior concentração de leptina e menor concentração de adiponectina (HIGA *et al*., 2014).

Já está bem estabelecido na literatura que o TFA promove efeitos benéficos em parâmetros como adiposidade corporal, glicemia e perfil lipídico (BÓDIS & RODEN, 2018; MADDEN et al., 2013; HIGA *et al.* 2014). Assim, o TFA é altamente recomendado para a prevenção da obesidade, pois reduz ou mantém o peso corporal através do aumento do gasto energético, e previne os efeitos deletérios resultantes do aumento do TAB, como por exemplo, as alterações no metabolismo de glicose (HIGA *et al.* 2014; MAZZUCATTO *et al*. 2014; ROSEN & SPIEGELMAN, 2006; SCHRAUWEN, 2007). No presente estudo, o TFA foi eficaz para reduzir o ganho de

peso e os danos na composição corporal do grupo TF-CAF, o que confirma os estudos prévios do nosso grupo (MULLER *et al*., 2018; HIGA *et al.* 2014). Esses resultados corroboram outros estudos que também mostraram a eficácia do TFA para a prevenção do ganho de peso e da adiposidade corporal em animais submetidos tanto à dieta de cafeteria quanto à dieta hiperlipídica (ROCHA-RODRIGUES *et al*., 2018; VAISY *et al*., 2011). Considerando que a ingestão calórica não foi diferente entre os grupos, os resultados de menor peso corporal e adiposidade possivelmente sejam decorrentes do maior gasto energético induzido pelo TFA.

Assim como a prevenção do aumento da massa adiposa, o TFA também impediu os prejuízos causados pela dieta de cafeteria ao metabolismo de glicose nos animais TF-CAF, conforme dados observados nos testes de tolerância à glicose e de tolerância à insulina. Dessa forma, o conjunto de dados metabólicos *in vivo* do presente estudo reforçam que o modelo experimental é eficaz para o desenvolvimento do fenótipo de obesidade e de RI, e por isso pode ser amplamente utilizado para o estudo dos mecanismos de prevenção e tratamento de tais doenças. Nesse sentido, considerando que o TAB foi o nosso alvo de estudo, e que os depósitos de TAB apresentam características endócrinas e metabólicas específicas (HERMSDORFF & MONTEIRO, 2004; SCHOETTL *et al*., 2018), optamos por dividir a discussão dos resultados de TAB em duas partes: uma com os resultados do TAB-PE e outra com os resultados do TAB-SC.

6.1 TAB-PE

Para atender parte dos objetivos propostos, foram avaliadas proteínas chaves do metabolismo de glicose e de lipídios, marcador de inflamação e os componentes das alças do SRA no depósito visceral de TAB-PE.

A ação da insulina através de seu receptor desencadeia a fosforilação da AKT (forma ativa). A fosforilação da AKT é fundamental para a captação de glicose, pois induz a translocação de transportadores de glicose GLUT-4 para a membrana celular, com posterior captação de glicose para o tecido (TAN *et al*., 2015; KILARI *et al*., 2015). No TAB-PE, houve redução na fosforilação e na razão AKT fosforilada/AKT total tanto

com o TFA quanto com a dieta de cafeteria nos grupos TF-NO, SED-CAF e TF-CAF. Assim, é possível que o TFA reduza a sinalização da insulina no TAB-PE, contribuindo para diminuir a lipogênese *de novo* nos grupos treinados (SMITH & KAHN, 2016; SONG *et al*., 2018). Por outro lado, o resultado no grupo SED-CAF pode ser um indicativo de RI periférica que coincide com os prejuízos apresentados por esse grupo no TTG e no TTI. Interessante que em nosso estudo prévio (HIGA *et al*., 2014), a redução da lipogênese *de novo* induzida pela dieta de cafeteria já tinha sido observada através de dosagem enzimática, mas não era sabido se uma possível redução na disponibilidade de substrato para a lipogênese *de novo* poderia contribuir para esta resposta. Cabe ressaltar que, no estudo de Higa *et al.* (2014), o aumento da massa adiposa foi associado à maior lipogênese clássica e menor oxidação lipídica.

Tanto a dieta de cafeteria quanto o TFA não modificaram a expressão proteica do transportador GLUT-4. Apesar de o aumento na expressão do GLUT-4 no músculo esquelético promovida pelo TFA já ter sido demonstrada (MACKENZIE & ELLIOT, 2014; PAULI *et al*., 2009) e, que estudos prévios tenham observado redução do GLUT-4 no TAB de animais com RI e DM2 (LEMIEUX *et al*., 2016; MACHADO *et al*., 1993; PAPA *et al*., 1997; PAPA *et al*., 2002), parece que no nosso modelo experimental, tais respostas não ocorrem. É importante ressaltar que o efeito da dieta e do TFA isolados e combinados sobre o translocamento do GLUT-4 para a membrana não pôde ser avaliado, já que a técnica utilizada quantificou o conteúdo total de GLUT-4 no tecido. Assim, não podemos descartar a possibilidade de redução no translocamento do GLUT-4 para a membrana no TAB-PE em função da redução na fosforilação da AKT no grupo SED-CAF.

Já nos grupos TF-NO e TF-CAF, mesmo com a redução na fosforilação da AKT, o translocamento do GLUT-4 no TAB-PE pode estar aumentado ou mantido. Isso porque, apesar de a insulina ser o principal hormônio responsável pela translocação do GLUT-4, esse processo também pode ocorrer de forma independente à ação da insulina através da AMPK (O'NEILL *et al*., 2012). A ativação da proteína AMPK é feita através da fosforilação do resíduo de tirosina 172, localizado na subunidade α. Esta ativação é induzida pelo decréscimo do nível energético celular determinado pelo aumento na relação AMP-ATP, ou decréscimo da creatina-fosfocreatina (GAIDHU &

CEDDIA, 2010; LIM *et a*l., 2010). No estudo prévio do nosso grupo, foi observado que o TFA aumentou a expressão da AMPK fosforilada no TAB-PE dos animais TF-NO e TF-CAF, e que esse efeito estava associado com a melhora no metabolismo de lipídios no TAB-PE (HIGA *et al*., 2014). Na ocasião, a sinalização da insulina não foi estudada.

No metabolismo de lipídeos, o processo de lipólise ocorre a partir da fosforilação da HSL pela proteína quinase A (PKA) nos resíduos de serina 563, 659 e 660 (ARNER, 2005; SHEN *et al*., 1998), e é essencial para a hidrólise do TG. A ATGL também exerce papel importante nesse processo, já que a ATGL cliva o primeiro AG participando da fase inicial da hidrólise de TG. Além disso, a perilipina também participa da lipólise, uma vez que impede o acesso da HSL ao TG. No presente estudo, a dieta de cafeteria aumentou tanto a fosforilação da HSL quanto a expressão da ATGL nos grupos SED-CAF e TF-CAF, sugerindo que tais proteínas foram responsivas à dieta de cafeteria e não ao TFA. Embora a perilipina não tenha sido diferente entre os grupos estudados, foi visto que a deficiência de HSL e ATGL no TAB reduzem a lipólise independente da modulação da perilipina (BÓDIS & RODEN, 2018). Nesse sentido, o aumento na expressão da HSL fosforilada e da ATGL podem ser suficientes para o aumento da lipólise nos grupos SED-CAF e TF-CAF. De fato, no nosso estudo prévio, foi demonstrado aumento da atividade lipolítica no TAB-PE por meio da estimulação com isoproterenol nos grupos SED-CAF e TF-CAF (HIGA *et al*., 2014).

Embora ambos os grupos com dieta de cafeteria tenham aumentado a expressão de proteínas envolvidas na lipólise, é possível que o significado e a repercussão desse efeito sejam diferentes entre os grupos SED-CAF e TF-CAF. No SED-CAF, o aumento na taxa lipolítica pode ser um indicador de RI, uma vez que a insulina exerce efeito anti-lipolítico no TAB (BÓDIS & RODEN, 2018). Já no TF-CAF, a maior atividade lipolítica pode estar relacionada com o aumento de AG para ser utilizado como fonte de energia pelo músculo esquelético durante o TFA (TSILOULIS & WATT, 2015; LIMA-SILVA *et al*., 2006). Enquanto no TF-CAF, o desvio de AGs para a oxidação favorece a menor deposição dos mesmos no TAB e, portanto, previne o aumento da adiposidade, no SED-CAF, o aumento da lipólise fornece maior quantidade de AGs para serem depositados ectopicamente em outros tecidos ou para serem reesterificados pelo próprio TAB. Como resultado, pode-se observar lipotoxicidade,

conforme demonstramos recentemente no rim (MULLER *et al*., 2018) e no fígado (dados ainda não publicados), e aumento da adiposidade decorrente da maior ativação de enzimas envolvidas na lipogênese clássica (HIGA *et al*., 2014).

A não observação de efeito do TFA sobre as proteínas marcadoras de lipólise no grupo TF-NO foram diferentes do esperado, pois no nosso estudo prévio havia sido demonstrado que os adipócitos isolados do TAB-PE do TF-NO, quando estimulados com isoproterenol, apresentaram aumento significativo na atividade lipolítica (HIGA *et a*l., 2014). Tais resultados nos permitem especular que, embora os métodos utilizados para a avaliação da lipólise sejam diferentes entre os estudos, o aumento na taxa lipolítica do TF-NO mediante o estímulo com mimético beta-adrenérgico revela que o TAB-PE está exercendo seu papel no suprimento da demanda energética do organismo de forma fisiológica, como durante a prática de exercício físico. Nesse caso, na condição basal, não haveria razão para o grupo TF-NO apresentar aumento na expressão de proteínas envolvidas na lipólise.

O aumento da inflamação e da RI no TAB são eventos que iniciam a RI sistêmica associada à obesidade e à síndrome metabólica (SCHOETTL *et al*., 2018). O TAB hipertrofiado na obesidade sintetiza citocinas pro-inflamatórias, que cronicamente induz a infiltração de macrófagos, monócitos e outras células do sistema imune (GUGLIELMI & SBRACCIA, 2018). No presente estudo, a expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 aumentou nos grupos SED-CAF e TF-CAF. Enquanto nos animais SED-CAF, a maior adiposidade e peso corporal justificam o aumento na IL-6, nos animais TF-CAF é possível que o próprio TFA seja responsável pela manutenção dos níveis elevados de IL-6, mesmo na condição de menor adiposidade e peso corporal. Isso porque é sabido que o TFA estimula a secreção de IL-6 pelo músculo esquelético, e que a IL-6 aumenta a captação de glicose e oxidação de lipídeos, bem como exerce efeitos semelhantes a hormônios que afetam o metabolismo de outros tecidos, como fígado (produção de glicose hepática) e TAB (aumento da lipólise) (CASTELLANI *et al*., 2015; PARK *et al*., 2014; YOU *et al*., 2013). Assim, é possível que a maior concentração de IL-6 no TAB seja decorrente da produção local ou oriunda da circulação, e que a IL-6 colabore para o maior fornecimento de lipídios ao músculo esquelético e ao fígado. Esse resultado corrobora tanto os nossos achados nos

marcadores de lipólise no grupo TF-CAF (aumento na expressão da HSL fosforilada e da ATGL), quanto o aumento na atividade lipolítica demonstrado por Higa *et al*. (2014).

O SRA é considerado um sistema endócrino em evolução. No presente estudo, foram avaliadas as duas principais alças do SRA, a alça ECA/Ang II/AT1 e a alça ECA2/Ang (1-7)/Mas. Nossos resultados revelaram que as atividades das enzimas ECA e ECA2 apresentaram padrões de resposta diferentes no depósito de TAB-PE e no soro. Enquanto a atividade da ECA circulante não modificou entre os grupos, a atividade da ECA2 circulante aumentou no grupo TF-NO, o que sugere que o TFA foi capaz de modular a atividade da ECA2 e que a dieta impediu essa resposta no grupo TF-CAF. Além disso, o TFA induziu o aumento na concentração de Ang (1-7) circulante em ambos os grupos treinados TF-NO e TF-CAF. Ou seja, embora a dieta de cafeteria tenha amenizado a resposta da ECA2 no grupo TF-CAF, o mesmo continuou com maior concentração de Ang (1-7). Esses resultados corroboram outros trabalhos que observaram que o TFA proporcionou aumento ou normalização dos componentes da alça ECA2/Ang(1-7)/Mas circulantes em ratos com insuficiência cardíaca e também em camundongos *knockout* para o receptor Mas, favorecendo importantes funções cardioprotetoras da Ang (1-7), incluindo efeitos anti-hipertensivos, anti-hipertróficos, anti-fibróticos e propriedades anti-trombóticos (GUIMARÃES *et al*., 2012; GOMES-SANTOS *et al.,* 2014; GIANI *et al*., 2010).

O TAB expressa todos os componentes do SRA. A produção de angiotensinogênio e de Ang II pode ser estimulada por nutrientes como AG de cadeia longa e glicose, hormônios como a insulina e citocinas. A ligação da Ang II ao receptor AT1 no TAB tem um efeito inibitório da adipogênese e da lipólise, o que favorece o estabelecimento de adipócitos maiores. Essa redução na diferenciação de adipócitos pela Ang II pode levar à predominância de grandes adipócitos disfuncionais caracterizados por um estado resistente à insulina e com inflamação crônica. A Ang II também se liga ao receptor AT2, através do qual induz aumento na produção das principais enzimas lipogênicas. Sendo assim, o efeito da alça clássica do SRA no TAB é aumentar o armazenamento de lipídios (PAHLAVANI *et al*., 2017; SLAMKOVA *et al*., 2016). Apesar de o grupo TF-NO apresentar 47% de redução na concentração de Ang II comparado ao grupo SED-NO no depósito de TAB-PE, não foram encontradas

diferenças estatísticas nos componentes da alça clássica do SRA. Esses resultados revelaram que os prejuízos metabólicos apresentados pelo grupo SED-CAF, como maior ganho de peso corporal e adiposidade, intolerância à glicose e RI, bem como modulação nas proteínas de metabolismo de glicose e lipídios, não foram associados com modificações na alça do SRA ECA/Ang II/AT1 no TAB-PE. Da mesma maneira, não foi observado efeito do TFA nessa alça do SRA no TAB-PE.

Na alça não clássica do SRA, um estudo prévio demonstrou que a ação do peptídeo Ang (1-7) no TAB via receptor Mas leva à melhora da sensibilidade à insulina, da tolerância à glicose e também do metabolismo lipídico, e reduz a formação de espécies reativas de oxigênio (SLAMKOVA *et al*., 2016). No presente estudo, a atividade da ECA2 no TAB-PE foi maior em ambos os grupos que consumiram a dieta de cafeteria SED-CAF e TF-CAF, sem repercussão para a concentração do peptídeo Ang (1-7) e da expressão do receptor Mas. Este aumento da atividade da ECA2 corrobora o estudo que mostrou que a ECA2 pode ser regulada nutricionalmente, no qual camundongos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram aumento na expressão e atividade da ECA2 (GUPTE *et al*, 2008). Apesar disso, o aumento da atividade enzimática não levou ao aumento nos níveis de Ang (1-7), possivelmente em função de outras ações da ECA2 no SRA, como a competição com a ECA pela Ang I, formando mais Ang (1-9), peptídeo cujas funções biológicas ainda não são bem conhecidas (FRANTZ *et al.*, 2018; RICE *et al*., 2004). Ou ainda, a ECA2 pode clivar a Ang A em Alamandina, que através do receptor MrgD (proteína G acoplada ao receptor relacionado ao Mas), apresenta funções vasodilatadoras e anti-fibróticas (FRANTZ *et al.*, 2018).

De maneira interessante, diferente dos níveis de peptídeos do SRA dosados, a razão Ang (1-7)/Ang II no TAB-PE sugere que o TFA promoveu maior biodisponibilidade de Ang (1-7) quando comparada a Ang II no grupo TF-NO, e que a dieta de cafeteria foi capaz de impedir essa modulação. Isso vai ao encontro com estudos que mostraram o efeito benéfico do TFA sob a alça não clássica do SRA (FRANTZ, *et al*., 2018; FRANTZ *et al*., 2017; GOMES-FILHO *et al.,* 2008), sugerindo assim, uma possível contribuição da ação da Ang (1-7) para melhora nos parâmetros metabólicos, já que ambos os peptídeos apresentam ações oposta e o balanço da

concentração desses peptídeos encontra-se deslocado para a Ang (1-7) no grupo TF-NO.

Em síntese, os resultados encontrados no soro confirmam o efeito do TFA na modulação da ECA2/Ang (1-7) no TF-NO, e que mesmo com a atenuação da resposta da ECA2 no TF-CAF, a concentração de Ang (1-7) permaneceu elevada, o que pode estar associada com a prevenção da obesidade e da RI. Embora algumas proteínas chaves do metabolismo de glicose e de lipídios, bem como a citocina IL-6 sejam moduladas pela dieta de cafeteria e pelo TFA, a não alteração das alças ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang(1-7)/Mas no TAB-PE revela que o SRA não participou dos mecanismos induzidos pelo TFA para a prevenção de obesidade e RI no nosso modelo experimental. Cabe ressaltar que, o único efeito induzido pelo TFA foi a maior biodisponibilidade de Ang (1-7) comparada a Ang II no TAB-PE do grupo TF-NO, o qual foi excluído na presença da dieta de cafeteria.

6.2 TAB-SC

No TAB-SC, foram avaliadas proteínas chaves para o metabolismo de glicose e de lipídios, marcadores de *browning* e também as alças do SRA. É conhecido na literatura que depósitos de gordura anatomicamente distintos devem ser considerados como "mini-órgãos separados", com populações de adipócitos heterogêneas derivadas de precursores embrionários distintos (CHAU *et al*., 2014). Do ponto de vista metabólico, sabe-se que o TAB-SC é responsável pela maior expressão de adipocinas quando comparado aos depósitos de TAB visceral. Porém, os depósitos de TAB visceral são considerados mais ativos por apresentarem maior sensibilidade à lipólise via catecolaminas, maior liberação de AG, maior resistência à ação da insulina, maior secreção de adipocinas ligadas aos processos pró-inflamatórios como resistina, Ang II e IL-6 (BÓDIS & RODEN, 2018; SCHOETTL *et al*., 2018; FONSECA-ALANIZ *et al*., 2006).

No presente estudo, apesar de não haver modificação na expressão da AKT fosforilada entre os grupos no TAB-SC, foi observada redução na razão AKT fosforilada/AKT total nos grupos TF-NO e TF-CAF. Esse resultado sugere que o TFA

diminui a sinalização da insulina no TAB-SC, e por consequência, pode contribuir para a redução da lipogênese *de novo* nos grupos treinados (FONSECA-ALANIZ *et al*., 2006). Embora tenha sido encontrada redução na expressão da AKT fosforilada e na razão AKT fosforilada/AKT total no TAB-PE do grupo SED-CAF, tais resultados não foram observados no TAB-SC, sugerindo a menor contribuição do TAB-SC para o desenvolvimento de RI no grupo SED-CAF.

De forma semelhante ao TAB-PE, não foi observada diferença na expressão proteica do GLUT-4 no TAB-SC. Conforme dito anteriormente, como a metodologia utilizada quantificou o conteúdo total do GLUT-4 e não o conteúdo translocado para a membrana celular, não podemos descartar a hipótese de modificação dessa proteína, já que em ambos os depósitos de TAB avaliados, observamos modificação em proteínas relacionadas com a translocação de vesícula contendo GLUT-4 para a membrana dos adipócitos. Isso mostra que são necessários experimentos mais adequados, sinalizando uma limitação do nosso estudo.

Interessante que no presente estudo, não observamos modificação na expressão proteica da AMPK total e fosforilada no TAB-SUB. Esse dado reforça que a regulação funcional dos depósitos de TAB é diferenciada, e que a ativação da AMPK no TAB pelo TFA acontece em depósito visceral e não subcutâneo, pelo menos no nosso modelo experimental. Essa afirmação é possível de fazê-la, uma vez que no estudo prévio do nosso grupo foi demonstrado aumento na expressão da AMPK fosforilada no TAB-PE induzido pelo TFA nos grupos TF-NO e TF-CAF (HIGA *et al*., 2014). Sendo assim, esses resultados revelam que os mecanismos acionados no TAB para a prevenção da RI no grupo TF-CAF são depósitos-dependentes.

Com relação aos marcadores de lipólise no TAB-SC, o grupo TF-CAF apresentou aumento tanto na expressão da HSL total quanto na razão HSL fosforilada/HSL total. O TFA também foi capaz de aumentar a expressão da proteína ATGL em ambos os grupos treinados comparados aos dois grupos sedentários. Tais resultados corroboram o peso do depósito de TAB-SC no grupo TF-CAF, haja visto o TFA prevenir o aumento desse depósito induzido pela dieta de cafeteria. Quando comparados os resultados de marcadores de lipólise nos dois depósitos de TAB,

identificamos que o TAB-PE foi mais responsivo ao estímulo da dieta de cafeteria, conforme os resultados apresentados pelos grupos SED-CAF e TF-CAF, e que o TAB-SC foi mais responsivo ao TFA, pois as alterações em proteínas lipolíticas ocorreram apenas nos grupos TF-NO e TF-CAF. Interessante que, em estudos prévios, já havia sido observado que seres humanos obesos e com RI apresentam maior resposta lipolítica às catecolaminas e maior RI no TAB visceral comparado ao TAB-SC (ARNER & LANGIN, 2014; WAJCHENBERG, 2000).

Os marcadores de termogênese/*browning* foram avaliados tanto por expressão gênica quanto proteica. A dieta de cafeteria reduziu a expressão gênica da UCP-1 (86%, sem estatística), UCP-2 e CIDEA no grupo SED-CAF, o que pode sinalizar redução na termogênese e no gasto de energia no depósito de TAB-SC, justificando o maior peso desse depósito e a hipertrofia dos adipócitos. Esse feito foi parcialmente prevenido pelo TFA no grupo TF-CAF, haja visto o TFA impedir tanto a redução na expressão em tais genes quanto a hipertrofia dos adipócitos induzida pela dieta de cafeteria. O aumento na expressão proteica da UCP-1 e o aumento em mais de 100% na expressão dos genes da UCP-1 e CIDEA no grupo TF-NO revela o potencial do TFA para a indução do *browning* no TAB-SC. Esse achado já foi demonstrado previamente por outros autores (BOSTROM *et al*., 2012; COHEN *et al*., 2014; NEDERGAARD *et al*., 2005). Interessante que o aumento do marcador de *browning* no TAB-SC não repercutiu em menores peso do depósito de TAB-SC, diâmetro e área dos adipócitos no grupo TF-NO. É possível que a atividade lipolítica, e consequentemente a disponibilidade de AG para oxidação, sejam fatores limitantes para o aumento na termogênese do TAB-SC, pois o grupo TF-NO apresentou apenas aumento da proteína de via lipolítica ATGL.

Com relação aos componentes do SRA, a redução na expressão do angiotensinogênio no grupo TF-NO pode indicar menor produção local do peptídeo ou a ativação da alça do SRA no TAB-SC em função da maior clivagem do peptídeo (FRANTZ et al., 2018; PAHLAVANI *et al*., 2017). Como não foi avaliada a concentração de Ang I e os resultados de Ang II não diferiram entre os grupos, é possível que o TFA tenha provocado redução na expressão do angiotensinogênio no TAB-SC do grupo TF-NO. Esse resultado não foi visto no TAB-PE, o que reforça mais uma vez as diferentes

respostas induzidas pelo TFA nos depósitos de TAB.

Embora não haja modificação na atividade da ECA e na concentração de Ang II no TAB-SC, observamos aumento na expressão dos receptores AT1 e AT2 no grupo TF-CAF. Considerando que a Ang II age preferencialmente por meio do receptor AT1, é possível que o grupo TF-CAF apresente aumento da ação da Ang II em decorrência da maior disponibilidade do receptor AT1. Nesse sentido, a hiperatividade da alça do SRA via AT1 no TAB pode inibir a adipogênese (PAHLAVANI *et al*., 2017; SLAMKOVA *et al*., 2016), reduzir a lipólise e o processo de *browning* (FRANTZ et al., 2018; JINJ et al., 2013; BARROSO *et al.,* 2002; MORI *et al.,* 2007, MARCUS *et al.,* 2013; SLANKOVA *et al.*, 2016). Esse resultado pode explicar os dados de marcadores de *browning* apresentados pelo grupo TF-CAF, uma vez que o TFA combinado com a dieta de cafeteria impediu o aumento dos marcadores de *browning* provocado pelo TFA. Por outro lado, embora a expressão do AT2 não tenha diferido estatisticamente no grupo TF-NO, o aumento em 50% pode de alguma maneira contribuir para a maior ação da Ang II via AT2. É sabido que a Ang II via receptor AT2 apresenta ações opostas às realizadas via receptor AT1. De fato, foi demonstrado que o tratamento crônico com o agonista do AT2 (Composto 21) reduz o tamanho dos adipócitos hipertrofiados e a massa do TAB em roedores alimentados com dieta hiperlipídica, sugerindo os efeitos favoráveis da ativação do AT2 para o tratamento da obesidade (THAN *et al*., 2017).

Na alça não clássica do SRA no TAB-SC, a dieta de cafeteria proporcionou aumento da atividade da ECA2 nos grupos SED-CAF e TF-CAF. Já no grupo TF-NO, observamos aumento nos níveis de Ang (1-7) mesmo sem aumento da atividade da ECA2 tecidual, sugerindo que o aumento do peptídeo pode ser proveniente da ação de outras enzimas, tais como a PEP (Prolil endopeptidase) ou da PCP (prolil carboxipeptidase) que clivam a Ang II em Ang (1-7), como também a partir da Ang I clivada pela NEP (Endopeptidase Neutra) ou pela PEP (FRANTZ, et al, 2018). Apesar de a concentração da Ang (1-7) não ser diferente no grupo TF-CAF, observamos aumento na expressão do receptor Mas, o que torna os adipócitos mais sensíveis ao peptídeo. Dentre as ações da Ang (1-7) por meio do receptor Mas no TAB, são descritos aumento da adipogênese (THAN et al., 2013), da lipólise e do *browning*, redução da lipogênese e melhora na tolerância a glicose e RI (FRANTZ et al., 2018;

PAHLAVANI et al., 2017; STERN et al., 2013). Mais recentemente foi descrito na literatura que a Ang (1-7) também atua via receptor AT2, induzindo aumento na adipogênese, redução na lipogênese e ativação do *browning* (THAN et al., 2017). Assim, os efeitos da Ang (1-7) por meio do receptor Mas corroboram os resultados metabólicos e de *browning* do TAB no grupo TF-NO. Interessante que, a maior expressão dos receptores Mas e AT2 no grupo TF-CAF possivelmente contribui para prevenir o prejuízo na expressão de genes termogênicos e a hipertrofia dos adipócitos do TAB-SC.

Finalmente, as correlações positivas observadas entre a expressão do marcador de *browning* UCP-1 e o kITT (r= 0,6), entre a UCP-1 e a concentração de Ang (1-7) no TAB-SC (r= 0,6), e entre a UCP-1 e a razão Ang (1-7)/Ang II no TAB-SC (r= 0,7) sugerem a associação do *browning* com melhor sensibilidade à insulina e com maior concentração de Ang (1-7). Esses resultados foram amplamente identificados no grupo TF-NO, no entanto, os animais do grupo TF-CAF obtiveram o efeito protetor do TFA contra o desenvolvimento de RI independente do *browning* e do aumento na concentração de Ang (1-7).

7. Conclusão

Em conclusão, o TFA preveniu a obesidade e a RI em animais submetidos à dieta de cafeteria, e a contribuição do TAB-PE e do TAB-SC foi por meio da redução na expressão de proteínas envolvidas na sinalização da insulina e do aumento na expressão de proteínas sinalizadoras de lipólise. Além disso, o TFA não impediu o aumento de marcador inflamatório no TAB-PE, porém preveniu o prejuízo na expressão de genes termogênicos no TAB-SC induzido pela dieta de cafeteria. A inalteração ou a modulação parcial de componentes das alças ECA/Ang II/AT1 e ECA2/Ang(1-7)/Mas no TAB-PE sugere que o SRA não participou dos efeitos induzidos pelo TFA associados à prevenção de obesidade e RI. No entanto, no TAB-SC, o aumento na concentração de Ang (1-7) no grupo dieta normocalórica e dos receptores Mas e AT2 no grupo dieta cafeteria induzido pelo TFA, sugerem a contribuição do SRA na prevenção de obesidade e RI.

8. Referências bibliográficas

ANDRADE, J. M. O.; *et al*. Proteomic white adipose tissue analysis of obese mice fed with a high-fat diet and treated with oral angiotensin-(1–7). **Peptides**, n.60, p.56-62, 2014.

ARAUJO, M. C.; *et al*. Peptidase specificity characterization of C- and N- terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v.39, p.8519-25, 2000.

ARNER, P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. **Best practice & research: clinical endocrinology & metabolism**, v.19, n.4, p.471-82, 2005.

ARNER, P.; LANGIN, D. Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity induced insulin resistance. **Trends endocrinology & metabolism**, n.25, p.255-262, 2014.

BAENA-DIEZ, J.; *et al.* Impaired fasting glucose and risk of diabetes mellitus at 10 years. Cohort study. **Medicina clinica**, v.136, n.9, p.382-385, 2011.

BAILEY, J. L. Insulin Resistance and Muscle Metabolism in Chronic Kidney Disease. **International scholarly research notices: endocrinology,** 2013.

BARROSO, S. G.; *et al*. A Participação do Tecido Adiposo Visceral na Gênese da Hipertensão e Doença Cardiovascular Aterogênica. Um Conceito Emergent. **Arquivo brasileiro cardiologia**, v.78, n.6, p.618-30, 2002.

BARTELT, A.; HEEREN, J. Adipose tissue browning and metabolic health. **Nature reviews endocrinology**, v.10, p.24–36, 2014.

BELLISSIMO, N.; AKHAVAN, T. Effect of Macronutrient Composition on Short-Term Food Intake and Weight Loss. **Advances in nutrition**, v.6, p.302S-308S, 2015.

BILMAN, V.; *et al*. Decreased hepatic gluconeogenesis in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1–7). **Peptides**, v.37, p.247–51, 2012.

BÓDIS, K.; RODEN, M. Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. **Europian journal of clinical investigation**, v.48, p.13017, 2018.

BOSTROM, P.; *et al*. A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v.481, p.463–468, 2012.

BRANDT, N.; *et al*. Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. **American journal of physiology-endocrinology and metabolism,** v.299, p.E215-E224, 2010.

CANNON, B.; NEDEGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physical Reviews**, v.84, n.1, p.277-359, 2004.

CASTELLANI, L.; *et al*. Exercise-mediated IL-6 signaling occurs independent of inflammation and is amplified by training in mouse adipose tissue. **Journal of applied physiology**, n.119, p.1347-1354, 2015.

CAWTHORN, W. P.; SETHI J. K. TNF-alpha and adipocyte biology. **FEBS letters**, v.582, n.1, p.117-31, 2008.

CHAU, Y.; *et al*. Visceral and subcutaneous fat have different origins and evidence supports a mesothelial source. **Nature cell biology**, v.16, p.367-375, 2014.

CHHABRA, K. H.; *et al*. Pancreatic angiotensin-converting enzyme 2 improves glycemia in angiotensin II-infused mice. **American journal of physiology-endocrinology and metabolism**, v.304, p.874–884, 2013.

CHONDRONIKOLA, M.; SIDOSSIS, L. S. Brown and Beige fat: From molecules to physiology. **Biochimica et biophysica acta - molecular cell research**, 2018.

CIAMPONE, S.; *et al*. Long term exercise attenuates blood pressure responsiveness and modulates kidney angiotensin II signaling an during urinary sodium excretion in SHR. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system**, v.12, p.394-403, 2011.

CINTI, S. Reversible physiological transdifferentiation in the adipose organ. **Proceedings of the nutrition society**, v.68, n.4, p.340-9, 2009.

COHEN, P.; *et al*. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. **Cell**, n.156, p.304-316, 2014.

COLAFELLA, K. M.; *et al*. Epochs in the depressor/pressor balance of the renin–angiotensin system. **Clinical Science**, v.130, p.761–771, 2016.

CONTI, F. F.; *et al*. Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. **American journal of physiology: Regulatory integrative and comparative physiology,** v.309, p.R1532-R1539, 2015.

CUNHA, T. S.; *et al*. Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance. **Regulatory peptides**, n.139, p.1-3, 2007.

D'ANGELO, E.; *et al*. Relationships between physical exercise practice, dietary behaviour and body composition in female university students. **The journal of sports medicine and physical fitness**, v.50, n.3, p.311-7, 2010.

DIAS, G. C.; *et al*. Teores de lipídios em refeições oferecidas em uma praça de alimentação de uma universidade privada do município de são paulo. **Revista simbio-logias**, 2011.

DONOGHUE, M.; *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. **Circulation research,** v.87, p.1-9, 2000.

DUNCAN, R. E.; *et al*. Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annual review of nutrition**, v.27, p.79-101, 2007.

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

EGUCHI, R.; *et al*. Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v.14, n.3, p.182-187, 2008.

ELMER, D. J.; *et al*. Inflammatory, lipid, and body composition responses to interval training or moderate aerobic training. **European journal of applied physiology,** v.116, p. 601–609, 2016.

FERNANDES, T.; *et al*. Aerobic Exercise Training–Induced Left Ventricular Hypertrophy Involves Regulatory MicroRNAs, Decreased Angiotensin-Converting Enzyme-Angiotensin II, and Synergistic Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2-Angiotensin (1-7). **Hypertension**, v.58, p.182-189, 2011.

FERRARIO, C. M.; *et al*. Counterregulatory Actions of Angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v.30, p.535-541, 1997.

FERREIRA, J. C.; *et al*. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v.34, n.8, p.760-5, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; *et al*. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia**, v.50, n.2, 2006.

FRANTZ, E. D. C.; *et al*. Modulation of the renin–angiotensin system in white adipose tissue and skeletal muscle: focus on exercise training. **Clinical Science**, v.132, p.1487-1507, 2018.

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

FRIEDMAN, J. M. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. **The american journal of clinical nutrition**, v.89, n.3, p.973S-979S, 2009.

GAIDHU, M. P.; *et al*. Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. **American journal of physiology-cell physiology**, v.298, n.4, p.C961-971, 2010.

GIANI, J. F.; *et al*. Angiotensin-(1–7) improves cardiac remodeling and inhibits growth promoting pathways in the heart of fructose-fed rats**. American journal of physiology-heart and circulatory physiology,** v.298, 2010.

GIRI, S.; *et al.* AICAR inhibits adipocyte differentiation in 3T3L1and restores metabolic alterations in diet-induced obesity mice model. **Nutrition & metabolism**, v.3, p.31, 2006.

GOLLISCH, K. S. C.; *et al*. 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**, v.297, p.495-504, 2009.

GOMES-FILHO, A.; *et al*. Selective increase of angiotensin (1–7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. **Experimental physiology**, v.93, p.589–98, 2008.

GOMES-SANTOS, I. L.; *et al*. Effects of Exercise Training on Circulating and Skeletal Muscle Renin-Angiotensin System in Chronic Heart Failure Rats. **Exercise in the renin-angiotensin system**, v.9, 2014.

GONÇALVES, G.; *et al.* O Bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v.84, n.4, 2005.

GUGLIELMI, V.; SBRACCIA, P. Obesity phenotypes: depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. **Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, v.23. p.3–14, 2018.

GUIMARÃES, G. G.; *et al*. Exercise induces renin–angiotensin system unbalanceand high collagenexpression in theheartof Mas-deficientmice. **Peptides**, v.38, p.54–61, 2012.

GUPTE, M.; *et al*. ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. **American journal of physiology: Regulatory, integrative, comparative physiology,** v.295, p.781-788, 2008.

HAMMARSTEDT, A.; GRAHAM, T. E.; KAHN, B. B. Adipose tissue dysregulation and reduced insulin sensitivity in non-obese individuals with enlarged abdominal adipose cells. **Diabetology & metabolic syndrome**, v.4, n.1, p.42, 2012.

HARIRI, N.; GOUGEON, R.; THIBAULT, L. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. **Nutrition research**, v.30, n.9, p.632-43, 2010.

HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia,** v.48, n.6, 2004.

HEYNE, A.; *et al*. An animal model of compulsive food-taking behaviour. **Addiction biology**, v.14, n.4, p.373-383, 2009.

HIGA, T. S. POTENCIAL DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO PARA A PREVENÇÃO DO DIABETES TIPO 2 INDUZIDO POR DIETA DE CAFETERIA: PAPEL DO TECIDO ADIPOSO BRANCO. Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. 100 p.

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

HIROSUMI, J.; *et al*. A central role fot JNK in obesity and insulin resistence. **Nature**, v.420, n.6913, p.333-6, 2002.

HOUSTIS, N.; ROSEN, E. D.; LANDER E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v.440, p.944-948, 2006.

HOWARD, J. K.; FLIER, J. S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins.**Trends in endocrinology and metabolism**, v.17, p.365–371, 2006.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metabolism**, v.5, n.4, p.237- 52, 2007.

HUNTER, G. R.; *et al*. Exercise training prevents regain of visceral fat for 1 year following weight loss. **Obesity**, v.18, n.4, p.690-695, 2010.

IACOBINI, C.; *et al*. Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity. **Metabolism clinical and experimental**, https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.009.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneos and visceral adipose tissue: sctructural and functional diferencies. **Obesity reviews**, v.11, n.1, p.1034-40, 2010.

INAGAMI, T.; *et al*. Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview. **Journal of hypertension**, v.12, n.10, p.S83-94, 1994.

International Association for the Study of obesity (IASO). About obesity. http://www.iaso.org/policy/aboutobesity/. Acessoem 10 mar 2014.

IRVING, B. A.; *et al*. Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. **Medicine and science in sports and exercise**, v.40, n.11, p.1863-1872, 2008.

JEŽEKA, P. P. Uncoupling mechanism and redox regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1). **Biochimica et biophysica acta - Bioenergetics**, https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2018.11.007, 2018.

JIALAL, I.; DEVARAJ, S. Subcutaneous adipose tissue biology in metabolic syndrome. **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v.33, n.1, 2018

JING, F.; *et al*. Role of renin–angiotensin–aldosterone system in adipose tissue dysfunction. **Molecular and cellular endocrinology**, v.378, p.23–28, 2013.

KELLEY, G. A.; *et al*. Aerobic exercise and resting blood pressure in older adults: a meta- analytic review of randomized controlled trials. **The journals of gerontology**, v.56, n.5, p.298-303, 2001.

KILARI, S.; *et al*. Endothelial Cell Surface Expressed Chemotaxis and Apoptosis Regulator (ECSCR) Regulates Lipolysis in White Adipocytes via the PTEN/AKT Signaling Pathway. **PLoS One**, n.10, v.12, p.e0144185, 2015.

KIM, H. J.; LEE, J. S.; KIM, C. K. Effect of exercise training on muscle glucose transporter 4 protein and intramuscular lipid content in elderly men with impaired glucose tolerance. **European journal of applied physiology**, v.93, n.3, p.353-358, 2004.

KLIMCAKOVA, E.; *et al*. Dynamic strength training improves insulin sensitivity without altering plasma levels and gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue in obese men. **Clinical endocrinology and metabolism**, v.91, n.12, p.5107-12, 2006.

KOHARA, K.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Angiotensin (1-7) in the spontaneously hypertensive rat. **Peptides**, n.14, p.883-891, 1993.

KUMADA, M.; *et al*. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.23, p.85–89, 2003.

LEE, I. S.; SHIN, G; CHOUE, R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. **Endocrine Journal**, v.57, n.1, p.39-50, 2010.

LEMIEUX, M.J.; *et al.* Inactivation of adipose angiotensinogen reduces adipose tissue macrophages and increases metabolic activity. **Obesity (Silver Spring)**, v.24, p.359–367, 2016.

LIM, C.T.; *et al*. AMPK as a mediator of hormonal signalling. **Journal of molecular endocrinology**, v.44, n.2, p.87-97, 2010.

LIMA-SILVA, A. E.; *et al*. Fat metabolism during exercise: regulatory mechanisms. **Brazilian journal of kinanthropometry and human performance**, v.8, p.106-114, 2006.

LOLOI, J.; *et al*. Angiotensin-(1-7) contributes to insulin-sensitizing effects of angiotensin converting enzyme inhibition in obese mice. **Phisiology**, 2018.

MACHADO, U. F.; SHIMIZU, Y.; SAITO, M. Decreased glucose transporter (GLUT 4) content in insulin-sensitive tissues of obese aurothioglucose- and monosodium glutamate- treated mice. **Hormone and metabolic research**, v.25, p.462-5, 1993**.**

MACKENZIE, R.W.; ELLIOTT, B.T. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: Targets and therapy**, v.7, p.55-64, 2014.

MADDEN, K. M. Evidence for the benefit of exercise therapy in patients with type 2 diabetes. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: Targets and therapy**, v.6, p.233-242, 2013.

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

MARCUS, Y.; *et al.* Adipose tissue renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) and

progression of insulin resistance. **Molecular and cellular endocrinology**, v.378, p.1-14, 2013.

MARINOU, K.; *et al*. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. **International journal of cardiology,** v.138, n.1, p.3-8, 2010.

MARWICK, T. H.; *et al*. Exercise training for type 2 diabetes mellitus: impact on cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v.119, n.25, p.3244-62, 2009.

MAZZUCATTO, F.; *et al.* Reversal of metabolic adaptations induced by physical training after two weeks of physical detraining. **International journal of clinical and experimental medicine**, v.15, p.2000-8, 2014.

MONTANARI, T.; *et al.* Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. **Obesity Reviews**, v.8, p.495-513, 2017.

MORI, Y.; *et al*. Angiotensin II receptor blockers downsize adipocytes in spontaneously type 2 diabetic rats with visceral fat obesity. **American journal of hematology**, v.20, n.4, 2007.

MORRISON, C. D.; *et al*. Implications of crosstalk between leptin and insulin signaling during the development of diet-induced obesity. **Biochimica et biophysica acta**, v.1792, n.5, p.409-416, 2009.

MULLER, C. R.; *et al*. Aerobic exercise training prevents kidney lipid deposition in mice fed a cafeteria diet. **Life Science**, v.15, n.211, p.140-146, 2018

NEDERGAARD, J.; *et al*. PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. **Biochimica et biophysica acta**, n.1740, p.293-304, 2005.

NETO, M.; *et al*. Equações de predição da aptidão cardiorrespiratória sem testes de exercício e sua aplicabilidade em estudos epidemiológicos: revisão descritiva e análise dos estudos. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v.9, n.5, p.304-14, 2003.

NORHEIM, F.; *et al*. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1a, irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. **FEBS Journal**, v.281, p.739–749, 2014.

O'NEILL, H.M.; HOLLOWAY, G.P.; STEINBERG, G.R. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: Implications for obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v.366, n.2, p.135-51, 2012.

OH, Y.; *et al.* Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1–7). **Peptides**, v.37, p.79–85, 2012.

OIGMAN, W.; M. NEVES, F. T. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. **Revista brasileira hipertensão**, v.7, p.261-267, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS (World Health Organization – WHO). ObesityandOverweight. United Nations, Estados Unidos da América, 2012. http://www.who.int/topics/obesity/en/. Acesso em 10 jul 2017.

OSWAL, A.; YEO, G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. **Obesity**, v.18, n.2, p.221-229, 2010.

PAHLAVANI, M. Regulation and Functions of the Renin-Angiotensin System in White and Brown Adipose Tissue. **Comprehensive physiology**, v.7 2017.

PAPA, P. C.; SERAPHIM, P. M.; MACHADO, U. F. Loss of weight restores GLUT 4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v.21, p.1065-70, 1997.

PAPA, P. C.; *et al*. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium gluta- mate-treated mice. **Life Science,** v.71, p.1917-28, 2002.

PARK, Y.; MYERS, M.; VIEIRA-POTTER, V. J. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction: Role of exercise. **Missouri Medicine**, n.111, p.1-65, 2014

PAULI, J. R.; *et al*. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia**, v.53, n.4, 2009.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHA, A. H. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. Obesidade: Causas e Conseqüências. **Arquivos brasileiros endocrinologia e metabolismo,** v.47, p.111-127, 2003.

PUNYADEERA, C.; *et al*. The effects of exercise and adipose tissue lipolysis on plasma adiponectin concentration and adiponectin receptor expression in human skeletal muscle. **European journal of endocrinology**, v.152, n.3, p.427-436, 2005.

RICE, G. I.; *et al*. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolismo. **Biochemical journal,** n.383, p.45–51, 2004.

RICHARD, D.; PICARD, F. Brown fat biology and thermogenesis. **Frontiers in bioscience,** v.1, n.16, p.1233-60, 2011.

ROCHA-RODRIGUES, S.; *et al*. Physical exercise mitigates high-fat diet- induced adiposopathy and related endocrine alterations in an animal model of obesity. **Journal of physiology and biochemistry**, p.1-12, 2018.

RONCON-ALBUQUERQUE, R. J.; *et al*. Attenuation of the cardiovascular and metabolic complications of obesity in CD14 knockout mice. **Life science**, n.83, p.502-10, 2008.

ROSEN E.D.; SPIEGELMAN B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis**. Nature**, v.444, p.847-853, 2006.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, n.6865, p.799-806, 2001.

SAMPEY, B.P.; *et al*. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**, v.19, n.6, p.1109-1117, 2011.

SANJULIANI, A. F.; *et al*. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: Bases fisiológicas e fisiopatológicas. **Revista do hospital universitário Pedro Ernesto**, 2011.

SANTOS, A.B; *et al*.; The role of exercise training in the renin-angiotensin system: A brief review. **Educação física em revista**, v.9, n.3, 2015.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J. Angiotensin-(1–7) and the renin–angiotensin system. **Current opinion in nephrology & hypertension**, v.16, p.122-128, 2007.

SANTOS, R. A.; *et al*. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the national academy of sciences,** v.100, p.8258-63, 2003.

SANTOS, S. H. S.; *et al*. Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. **Regulatory peptides**, v.178, p.64–70, 2012.

SANTOS, S. H. S.; *et al*. Oral administration of angiotensin-(1–7) ameliorates type 2 diabetes in rats. **Journal of molecular medicine**, v.92, p.255–265, 2014.

SANTOS, S. H. S.; *et al*. Oral Angiotensin-(1–7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF-kB in rats fed with high-fat diet. **Peptides**, v.46, p.47–52, 2013.

SANTOS, S.H.; *et al.* Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1–7). **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.30, n.5, p.953-961, 2010.

SCALZO, R. L.; *et al*. Regulators of Human White Adipose Browning: Evidence for Sympathetic Control and Sexual Dimorphic Responses to Sprint Interval Training. **Plos one**, v.9, 2014.

SCHOETTL, T.; *et al*. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. **Journal of experimental biology,** v.221, 2018.

SCHRAUWEN, P. High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. **The proceedings of the nutrition society**, v.66, n.1, p.33-41, 2007.

SCHWENK, R.W.; *et al*. Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. **Prostaglandins leukot essent fatty acids**, v.82, n.4-6, p.149-54, 2010.

SEPA-KISHI, D. M.; CEDDIA, R. B. White and beige adipocytes: are they metabolically distinct? **Hormone molecular biology and clinical investigation**, 2018.

SHEN, W. J.; *et al*. Mutational analysis of structural features of rat hormone-sensitive lipase. **Biochemistry**, v.37, p.8973– 8979, 1998.

SHI, Y.; CHENG, D. Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. **American journal of physiology-endocrinology and metabolism**, v.297, n.1, p.E10-8, 2009.

SHUNGIN, D.; *et al*. New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution. **Nature**, n.518, p.187-196, 2015.

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

SLAMKOVA, M.; ZORAD, S.; KRSKOVA, K. Alternative renin-angiotensin system pathways in adipose tissue and their role in the pathogenesis of obesity. **Endocrine regulations**, v.50, n.4, p.229-240, 2016.

SMITH, U.; KAHN, B. B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. **Journal of internal medicine**, v.280, n.5, p.465-475, 2016.

SONG, Z.; *et al*. Regulation and metabolic significance of *de novo* lipogenesis in adipose tissues**. Nutrients**, v.10, p.1383, 2018.

SORIGUER, F.; *et al*. Factors determining weight gain in adults and relation with glucose tolerance. **Clinical endocrinology**, v.10, n.2, p.103-10, 2012.

SPERETTA, G. F. F; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. G. O. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista HUPE**, n.13, n.1, 2014.

SPRANGER, J.; *et al*. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, v.361, p.226-228, 2003.

STERN, N. Angiotensin 1-7 as means to prevent the metabolic syndrome: Lessons from the fructose-fed rat model. **Diabetes,** n.62, p.1121-1130, 2013.

SZTALRYD, C.; *et al*. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. **The journal of cell biology**, v.161, n. 6, p.1093-1103,

2003.

TABONY, A. M.; *et al*. Angiotensin ii upregulates pp2cα and inhibits ampk signaling and energy balance leading to skeletal muscle wasting. **Hypertension**, v.58, n.4, p.643-649, 2011.

TAKEUCHI, K.; REUE, K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.296, n.6, p.E1195-209, 2009.

TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. **American journal of physiology-heart and circulatory physiology**, v.289, p.1560-1566, 2005.

TAN, S.; *et al*. Selective Insulin Resistance in Adipocytes. **Journal of biological chemistry**, v.290, n.18, 2015.

THAN, A.; *et al*. Angiotensin type 2 receptor activation promotes browning of white adipose tissue and brown adipogenesis. **Signal transduction and targeted therapy**, v.2, p.17022, 2017.

THAN, A.; LEOW, M.K.; CHEN, P. Control of adipogenesis by the autocrine interplays between angiotensin 1-7/Mas receptor and angiotensin II/AT1 receptor signaling pathways. **The journal of biological chemistry,** v.288, p.15520-15531, 2013.

TIPNIS, S. R.; *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme.Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **The journal of biological chemistry**, v.275, p.33238-33243, 2000.

TSILOULIS, T.; WATT, M. J. Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism. **Molecular and cellular regulation of adaptation to exercise**, p.175-201, 2015.

UMPIERRE, D.; *et al*. Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA1c levels in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the american medical association**, v.305, n.17, p.1790-1799, 2011.

Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL). Portal do Governo Brasileiro. Disponível em: < http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel.pdf> Acesso em: 23 mar. 2018.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocrine reviews**, n.21, p. 697−738, 2000.

WANG, H.; ECKEL, R. H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. **American journal of physiology-endocrinology and metabolism**, v.297, n.2, p.E271-88, 2009.

WILLIAMS, I. M.; *et al*. Chronic angiotensin (1–7) improves insulin sensitivity in high-fat fed mice independent of blood pressure. **Hypertension**, n.67, p.983-991, 2016.

WU, X.; *et al*. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. **Diabetes**, v.52, p.1355-1363, 2003.

XU, X.; *et al*. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue.American journal of physiology. **Regulatory, integrative and comparative physiology**, v.300, n.5, p.1115-1125, 2011.

YAMAGUCHI, T.; *et al*. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nature medicine**, v.8, p.1288-1295, 2002.

YOON, M. J.; *et al*. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **Diabetes**, v.55, n.9, p.2562-2570, 2006.

YOU, T.; *et al*. Effects of Exercise Training on Chronic Inflammation in Obesity Current Evidence and Potential Mechanisms. **Sports Medicine**, n.43, p.243-256, 2013.

ZHOU, Y.; *et al*. The formation of brown adipose tissue induced by transgenic over-expression of PPARc2. **Biochemical and biophysical research communications**, n.446, p.959-964, 2014.

ZORAD, S.; *et al*. Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. **European journal of pharmacology**, v.552, n.1-3, p.112-22, 2006.

MEDICINA
USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 20/01/2015, **APROVOU "Ad Referendum"** o Protocolo de Pesquisa nº **002/15** intitulado: **"Prevenção da obesidade e da resistência à insulina através do treinamento físico: papel do Sistema renina-angiotensina no tecido adiposo branco"** que utilizará **60** animais da espécie **camundongo e que será tese de mestrado da aluna Anna Laura Viacava Américo, tendo como orientadora a Profa. Dra. Fabiana de Sant'Anna Evangelista** apresentado pela **Comissão Científica do INCOR.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: José Eduardo Krieger
Pesquisador (a) Executante: Anna Laura Viacava Américo

CEUA-FMUSP, 20 de Janeiro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br