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

CYNTHIA RODRIGUES MULLER

**Potencial do treinamento físico para a prevenção de
danos renais em camundongos: papel da proteína
ativada por AMP (AMPK)**

São Paulo

2018

CYNTHIA RODRIGUES MULLER

**Potencial do treinamento físico para a prevenção de
danos renais em camundongos: papel da proteína
ativada por AMP (AMPK)**

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

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Muller, Cynthia Rodrigues

Potencial do treinamento físico para a prevenção
de danos renais em camundongos : papel da proteína
ativada por AMP (AMPK) / Cynthia Rodrigues Muller.
-- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fabiana de Sant'Anna Evangelista.

Descritores: 1.Doença renal crônica 2.Lipídeos
3.Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) 4.Sistema
renina-angiotensina

USP/FM/DBD-173/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Este trabalho é dedicado aos meus pais Silvana e Olympio. Sem eles nada disso seria possível. Dedico a eles, pois me ensinaram a lutar, a ter responsabilidade e caráter. Convenceram-me que eu poderia ser qualquer coisa que eu sonhasse em ser, sonharam junto comigo. Sempre me incentivando e caminhando lado a lado. Pelo apoio e amor incondicional.

Agradecimentos

À minha orientadora Fabiana S. Evangelista pela dedicação ao longo desses anos e por me ensinar muito além do que a formação acadêmica exige. Com ela aprendi também a nunca desistir, e esse ensinamento estará comigo por toda a minha vida.

À Dra. Patrícia Fiorino por sempre acreditar no meu potencial, por me acompanhar nessa jornada, por me ensinar os primeiros passos na ciência, pelas horas de conversa de incentivo e por estar sempre à disposição quando eu preciso.

À Dra. Miriam H Fonseca Alaniz por sempre estar ao meu lado me auxiliando e incentivando. Pelos inúmeros ensinamentos de bancada, pelas preciosas sugestões.

Aos amigos Ana Paula Leite, Renata O. Pereira, Bruno Vecchiatto, Marília Marcondes e Luiz Felipe Martucci pelos momentos de troca de conhecimento, de angústias e de alegrias.

Em especial à grande amiga Anna Laura V. Américo, por estar à disposição para absolutamente tudo que precisei, por me ouvir e me ajudar a acreditar que sempre há uma saída: obrigada por ser a “minha pessoa”.

Ao meu irmão por compartilhar todo seu amor comigo.

Ao Fernando Dos Santos por estar comigo em todas as horas, sempre me apoiando e ajudando na vida profissional e pessoal. Por me fazer sentir especial e se fazer presente mesmo quando distante. Por que juntos somos mais fortes.

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 CAPES pelo apoio financeiro, obrigada!

Resumo

Muller CR. *Potencial do treinamento físico para a prevenção de danos renais em camundongos: papel da proteína ativada por AMP (AMPK)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O acúmulo de lipídeos associado à obesidade, resistência à insulina (RI) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) pode levar ao desenvolvimento de danos renais, e diversos mecanismos podem estar envolvidos neste processo, dentre os quais: 1) redução na atividade da proteína ativada por AMP (AMPK); 2) hiperativação do sistema renina angiotensina (SRA) e consequente aumento na produção de angiotensina II (Ang II). O treinamento físico aeróbio (TFA) promove melhora metabólica significativa, no entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares induzidos pelo TFA contra o desenvolvimento de danos renais associados com doenças metabólicas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do TFA para a prevenção de danos renais induzidos por dieta de cafeteria, e a participação do SRA e da proteína AMPK nessa resposta. Para isso, camundongos machos adultos C57BL6/J foram separados em grupos (n=13/grupo) sedentários (SED) alimentados com dieta normocalórica (NO) ou de cafeteria (CAF) (SED-NO e SED-CAF, respectivamente) e treinados (TF) alimentados com dieta NO ou CAF (TF-NO e TF-CAF, respectivamente). O TFA foi realizado a 60% da capacidade máxima, simultaneamente com as dietas durante 8 semanas. A dieta de cafeteria causou maior adiposidade, intolerância à glicose e RI no grupo SED-CAF, enquanto o TFA preveniu esses prejuízos no grupo TF-CAF. Os animais SED-CAF apresentaram 88% de aumento no ritmo de filtração glomerular (RFG), maior deposição lipídica renal e redução do espaço de Bowman comparado ao SED-NO, as quais foram prevenidas no grupo TF-CAF. Não houve alteração no conteúdo de colágeno IV e fibronectina, entretanto o TNF- α aumentou em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria. Houve aumento de 27% da expressão proteica da p-AMPK no grupo TF-CAF, sem diferenças na expressão de t-ACC, p-ACC, PGC1- α e SIRT-1. A expressão gênica do SREBP-1 não diferiu entre os grupos, porém a expressão do SREBP-2 aumentou nos grupos SED-CAF e TF-CAF comparado aos grupos SED-NO e

TF-NO. No soro, apenas a atividade da ECA2 aumentou nos grupos TF-NO e TF-CAF comparados aos sedentários. No rim, a atividade da ECA aumentou 46% no grupo SED-CAF comparado ao SED-NO, e o TFA foi capaz de prevenir esse aumento. No entanto, a Ang II renal aumentou nos grupos SED-CAF, TF-NO e TF-CAF comparados ao grupo SED-NO. Não houve diferença nos componentes do SRA ECA2/Ang 1-7/Mas renal. Em conclusão, o TFA preveniu os danos renais causados pela dieta de cafeteria, tais como acúmulo de lipídeos nos rins, aumento do RFG e redução do espaço de Bowman, e essa resposta está associada, pelo menos em parte, com a maior ativação da AMPK independente da contribuição do SRA.

Descritores: doença renal crônica; lipídeos; proteína ativada por AMP (AMPK); sistema renina-angiotensina.

Abstract

Muller CR. *Potential of aerobic exercise training to prevent kidney damage in mice: the role of AMP-activated protein (AMPK)* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Lipid accumulation observed in the obesity, insulin resistance (IR) and Diabetes Mellitus type 2 (DM2) may lead to the development of renal damage, and several mechanisms may be involved in this process, such as: 1) reduction in the AMP-activated protein (AMPK) activity; 2) hyperactivation of the renin angiotensin system (RAS) and consequent increase in the production of Angiotensin II (Ang II). Aerobic exercise training (AET) promotes significant metabolic improvement, however, little is known about the cellular mechanisms induced by AET against the development of kidney damage associated with metabolic diseases. Thus, the present study aimed to evaluate the potential of AET to prevent kidney damage induced by cafeteria diet, and the participation of RAS and AMPK protein in this response. Adult male C57BL6/J mice were separated into sedentary (SED) groups fed a normocaloric (NO) or cafeteria (CAF) (SED-NO and SED-CAF, respectively) and trained (TF) fed a NO or CAF diet (TF-NO and TF-CAF, respectively). The AET was performed at 60% of the maximum capacity simultaneously with the diets during 8 weeks. The cafeteria diet induced adiposity increase, glucose intolerance and IR, while AET prevented these changes. Animals SED-CAF increased 88% of glomerular filtration rate (GFR), increased renal lipid deposition and reduced Bowman's space compared to SED-NO, which were prevented by AET in the TF-CAF group. There was no change in the collagen IV and fibronectin, however TNF- α increased in both cafeteria diet fed groups. There was a 27% increase in the protein p-AMPK expression in the TF-CAF group, with no changes in t-ACC, p-ACC, PGC1- α and SIRT-1 expression. The SREBP-1 gene expression did not change among groups, but SREBP-2 gene expression increased in the SED-CAF and TF-CAF groups compared to the SED-NO and TF-NO groups. In the serum, only the activity of ACE 2 increased in TF-NO and TF-CAF groups compared to sedentary groups. In the kidney, ACE activity increased 46% in the SED-CAF group compared to SED-NO, nevertheless the AET was able to

prevent this increase. Renal Ang II concentration increased in SED-CAF, TF-NO and TF-CAF groups compared to the SED-NO. No differences were observed in the components of renal RAS ACE2/Ang 1-7/Mas. In conclusion, AET prevented the renal damage caused by cafeteria diet, such as lipid accumulation, increased GFR and reduced Bowman space, and these responses are associated, at least in part, with greater activation of the AMPK protein independent of the RAS contribution.

Descriptors: chronic kidney disease; lipids; AMP-activated protein kinase (AMPK); renin-angiotensin system.

Lista de figuras

Figura 1: Deposição lipídica intra-renal e repercussões morfofuncionais para os rins	26
Figura 2: Aumento da deposição lipídica decorrente de prejuízo na sinalização da via da proteína AMPK.....	28
Figura 3: Representação do SRA e interação com a via da AMPK.....	31
Figura 4: Efeitos celulares do TFA para a prevenção de deposição lipídica intra-renal	33
Figura 5: Representação esquemática do TFA	38
Figura 6: Representação esquemática do desenho experimental.....	39
Figura 7: Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico realizado pré-TFA	47
Figura 8: Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico pós-TFA	47
Figura 9: Evolução do peso corporal.....	48
Figura 10: Ganho de peso corporal.....	49
Figura 11: Consumo hídrico em gaiola metabólica durante 24 horas	50
Figura 12: Volume de urina coletado em gaiola metabólica durante 24 horas.	50
Figura 13: Razão entre o consumo de água e o volume urinário	51
Figura 14: Consumo de ração	52
Figura 15: Coeficiente metabólico dos grupos experimentais.	53
Figura 16: Glicemia de jejum.....	53
Figura 17: Curva glicêmica.....	54
Figura 18: Curva de decaimento de glicose	55
Figura 19: Creatinina sérica (A); Creatinina excretada (B); Ritmo de filtração glomerular (RFG) (C)	56
Figura 20: Ureia excretada (A); Ureia sérica (B)	57
Figura 21: Proteína total excretada	58

Figura 22: Razão proteína urinária/creatinina urinária	58
Figura 23: Potássio excretado.....	59
Figura 24: Sódio excretado	59
Figura 25: Cloreto excretado	59
Figura 26: Osmolaridade na urina	60
Figura 27: Deposição lipídica renal	60
Figura 28: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais corados com oil red O	61
Figura 29: Área da cápsula de Bowman	61
Figura 30: Área do tufo glomerular.....	62
Figura 31: Diâmetro do tufo glomerular.....	62
Figura 32: Área do espaço de Bowman	63
Figura 33: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renal.....	63
Figura 34: Conteúdo de fibronectina nos rins.....	64
Figura 35: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais, marcação fibronectina	64
Figura 36: Colágeno Total representado em porcentagem por área.....	65
Figura 37: Colágeno Glomerular	65
Figura 38: Conteúdo de Colágeno IV nos rins.....	66
Figura 39: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais, marcação Colágeno IV	66
Figura 40: Conteúdo de TGF- β nos rins.....	67
Figura 41: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais, marcação TGF- β	68
Figura 42: Expressão proteica de TGF- β	68
Figura 43: Expressão proteica de IL-6	69
Figura 44: Expressão proteica de TNF- α	70

Figura 45: Expressão gênica SREBP-1	71
Figura 46: Expressão gênica SREBP-2	71
Figura 47: Expressão proteica da AMPK total (A), fosforilada (B) e razão p-AMPK/t-AMPK (C)	73
Figura 48: Expressão proteica da SIRT-1	74
Figura 49: Expressão proteica da PGC1- α	74
Figura 50: Expressão proteica da ACC total (A), fosforilada (B) e razão p-ACC/t-CC (C)	76
Figura 51: Atividade da citrato sintase	76
Figura 52: Atividade da β -HAD.....	77
Figura 53: Atividade da ECA no soro (A); Atividade da ECA2 no soro (B)	78
Figura 54:Atividade da ECA no rim	78
Figura 55: Conteúdo de angiotensina II no rim.....	79
Figura 56: Expressão proteica da AT2	79
Figura 57: Atividade da ECA2 no rim	80
Figura 58: Conteúdo de angiotensina 1-7 no rim	80
Figura 59: Expressão proteica do receptor Mas.....	81

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição nutricional e valor energético das dietas	37
Tabela 2: <i>Primers</i> para amplificação dos genes.....	42
Tabela 3: Peso de rins e tecidos normalizados pelo peso corporal dos animais.....	49

Lista de abreviaturas

ACC- Acetil-CoA Carboxilase

Ang II – Angiotensina II

AT1- Receptor de Angiotensina tipo 1

Agn 1-7 – Angiotensina 1-7

AMP- Adenosina Monofosfato

AMPK – Proteína Ativada por AMP

β -HAD - β -hidroxiacil-CoA desidrogenase

CPT1- Carnitina Palmitoil Transferase 1

DGAT2- Diacilglicerol transferase 2

DM2- Diabetes Mellitus Tipo 2.

DRC- Doença Renal Crônica

ECA- Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2- Enzima Conversora de Angiotensina 2

FAS - Ácido Graxo Sintase

FOXO- Família de Fatores de Transcrição importantes na regulação de processos metabólicos

GLUT-4- Transportador de Glicose tipo 4

IL-6- Interleucina 6

IMC- Índice de massa corporal

KIM-1- Molécula de Injúria Renal -1

ND - Nefropatia Diabética

NF- κ B- Fator nuclear κ B

OMS - Organização Mundial da Saúde

PGC1- α - Coativador 1 Alfa do Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma

PPAR α - Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Alfa

RFG- Ritmo de Filtração Glomerular

RI- Resistência à Insulina

SIRT-1- Sirtuina 1

SRA – Sistema Renina Angiotensina

SREBP-1c- Proteínas Ligantes aos Elementos Regulados por Esteróides tipo 1

SREBP-2- Proteínas Ligantes aos Elementos Regulados por Esteróides tipo 2

STZ – Streptozotocina

TAB- Tecido Adiposo Branco

TFA- Treinamento Físico Aróbio

TGF- β - Fator de Crescimento de Transformação Beta

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TTG- Teste de Tolerância à Glicose

TTI- Teste de Tolerância à Insulina

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Sumário

Agradecimentos.....	3
Resumo	5
Abstract	7
Lista de figuras	9
Lista de tabelas.....	13
Lista de abreviaturas	15
1.Introdução.....	19
2. Revisão de literatura.....	22
2.1 Obesidade, resistência à insulina e danos renais.....	22
2.2 Mecanismos celulares responsáveis pelos danos renais	24
2.3 Efeitos do treinamento físico aeróbio	31
3. Objetivos.....	35
3.1 Gerais.....	35
3.2 Específicos	35
4. Materiais e Métodos	37
4.1. Amostra	37
4.2. Dietas alimentares.....	37
4.3. Protocolo de treinamento físico aeróbio	38
4.4. Desenho experimental.....	38
4.5. Teste de esforço físico máximo	39
4.6. Determinação do peso corporal.....	39
4.7. Gaiola metabólica.....	40
4.8 Avaliações glicêmicas	40
4.9 Coleta de sangue e tecidos	41
4.10. Expressão gênica	41

4.11. Quantificação proteica	42
4.12. Dosagem da atividade das enzimas citrato sintase e β -HAD	43
4.13. Histologia.....	44
4.13.1 Avaliação da deposição lipídica renal	44
4.13.2 Morfometria glomerular	44
4.13.3 Avaliação da deposição de colágeno	45
4.14. Imunohistoquímica	45
4.15. Atividade das enzimas ECA e ECA2	45
4.16 Quantificação das angiotensinas.....	46
4.17. Análise estatística.....	46
5. Resultados.....	47
5.1. Capacidade física	47
5.2. Peso corporal e peso dos rins	48
5.3 Respostas metabólicas	49
5.4. Respostas glicêmicas.....	53
5.5. Função renal.....	55
5.6. Deposição lipídica renal	60
5.7. Resposta morfológica glomerular e fibrose tecidual	61
5.8. Perfil inflamatório.....	66
5.9. Resposta do metabolismo lipídico no tecido renal.....	70
5.10. Componentes do SRA.....	77
6. Discussão	83
7. Conclusão.....	97
8. Referências Bibliográficas	99

1. Introdução

O rim apresenta importantes funções, tais como eliminação de material indesejado produzido pelo metabolismo corpóreo, regulação do volume e da composição dos líquidos corporais e regulação da pressão arterial. Por isso, prejuízos funcionais e estruturais renais, como observados na doença renal crônica (DRC), podem comprometer o funcionamento de todos os outros órgãos (BASTOS *et al.*, 2004; GUYTON & HALL, 2006). A DRC tornou-se um problema de saúde pública por afetar uma proporção considerável de indivíduos e por ser considerada fator de risco para doenças cardiovasculares e morte prematura. Na DRC pode-se observar lesão, perda progressiva e irreversível da função renal, de tal forma que na fase mais avançada, definida por fase terminal da insuficiência renal crônica, os rins não conseguem mais desempenhar suas funções no organismo do indivíduo (LOCATELLI *et al.*, 2006).

Prejuízos estruturais e funcionais no rim estão associados com disfunções metabólicas, tais como observadas na obesidade, na resistência à insulina (RI) e no diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Em indivíduos obesos, a elevação das necessidades metabólicas basais e, portanto, o acúmulo de produtos do metabolismo celular, é acompanhado de aumento no fluxo sanguíneo regional, no débito cardíaco e na pressão arterial, os quais cronicamente provocam prejuízos na função renal (DE PAULA, 2006). A relação entre a obesidade, o risco de DRC e a microalbuminúria já foi demonstrada previamente (CHEN, 2004), e um dos possíveis gatilhos para o desenvolvimento de danos renais associados às disfunções metabólicas é o aumento na deposição de lipídeos nos rins (KEANE, 2000). Sun *et al.* (2002) observaram acúmulo de lipídeos no rim de animais diabéticos, enquanto Bobulescu *et al.* (2014) demonstraram correlação positiva entre índice de massa corporal (IMC) e aumento de triglicérides no rim de humanos. Outro estudo mais recente relatou que animais alimentados com dieta hiperlipídica aumentam a deposição de lipídeos nos rins (WANG *et al.*, 2018). O acúmulo de lipídeos nos rins promove aumento na atividade de enzimas lipogênicas,

inflamação, fibrose, glomeruloesclerose e proteinúria (ISHIGAKI *et al.*, 2007; SOETIKNO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2018).

Uma das vias de sinalização intracelular que pode estar associada ao desenvolvimento de danos renais na presença de doenças metabólicas é regulada pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (SALMINEN *et al.*, 2011). A AMPK é uma importante proteína que funciona como sensor de energia do organismo e dos tecidos, e que está envolvida na metabolização de glicose e de ácidos graxos para a síntese de ATP (HARDIE, 2018). Prejuízos metabólicos no tecido renal de animais obesos e diabéticos foram associados à redução na expressão da AMPK e, consequente acúmulo de lipídeos, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (KIM *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2017).

A atividade da proteína AMPK pode ser regulada por diferentes fatores, dentre os quais, o peptídeo angiotensina II (Ang II) do sistema renina angiotensina (SRA). Além da Ang II, a enzima conversora de angiotensina (ECA) e o receptor AT1 formam a alça clássica do SRA denominada de ECA/Ang II/AT1. A interação entre Ang II e AMPK foi evidenciada no estudo de Yang *et al.* (2016), no qual foi demonstrado que o aumento da Ang II em ratos com nefrectomia unilateral provocou inibição da AMPK. Interessante que, quando os ratos foram tratados com inibidor da ECA, o efeito da Ang II sobre a AMPK foi abolido. As ações da Ang II sobre o rim também ocorrem independente da AMPK, pois quando aumentada, pode induzir hipertensão, hiperfiltração glomerular e aumento na reabsorção de sódio nos segmentos proximais do néfron (HALL *et al.*, 2015). Pode também potencializar a microalbuminúria (MAUER *et al.*, 2009) e a lesão tubular (NIELSEN *et al.*, 2009), favorecendo o desenvolvimento da nefropatia diabética (ND) (CULVER, *et al.*, 2017).

O SRA possui outra alça, denominada de não clássica, que é formada pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), pela angiotensina 1-7 (Ang 1-7) e pelo receptor Mas (ECA2/Ang 1-7/Mas) (TALLANT *et al.*, 2005; FERRARIO *et al.*, 1997; CULVER *et al.*, 2017). Esta alça, quando acionada, promove efeitos antagônicos aos da alça clássica, incluindo efeitos anti-hipertensivos, anti-hipertróficos, anti-fibróticos e anti-trombóticos (GIANI *et al.*,

2010; FERRARIO *et al.*, 1997; CULVER *et al.*, 2017). A ação da ECA2 pode inibir os efeitos deletérios teciduais da Ang II e contribuir para a prevenção dos danos renais através da transformação de Ang II em Ang 1-7. No entanto, esse mecanismo ainda é bastante controverso, conforme discutido por Zimmerman & Burns (2012).

A utilização de estratégias não farmacológicas para o tratamento da obesidade, da RI e do DM2 tem sido amplamente discutida na literatura, e o treinamento físico aeróbio (TFA) é alvo importante de estudo devido aos resultados positivos obtidos, tais como redução da adiposidade (LEHNIG & STANFORD, 2018), melhora na glicemia de indivíduos diabéticos, principalmente através do aumento na sensibilidade à insulina (WINNICK *et al.*, 2008; DINCER *et al.*, 2016), aumento na expressão de receptor de insulina e de transportador de glicose GLUT4 no músculo esquelético (RICHTER & HARGREAVES, 2013). Além disso, Agarwal *et al.* (2012) demonstraram que o TFA promove adaptações morfofuncionais benéficas no rim que podem contribuir para o tratamento de danos renais. Por outro lado, Leehey *et al.* (2016) não encontraram melhoras na função renal de pacientes com DRC submetidos ao treinamento físico combinado (aeróbio e resistido). Esses resultados revelam a necessidade de novos estudos para melhor entendimento dos efeitos do TFA no rim.

Parte das adaptações induzidas pelo TFA é mediada pela ativação da proteína AMPK e consequente melhora na oxidação de lipídeos em tecidos muscular, hepático e adiposo (IX & SHARMA, 2010). Sabe-se que indivíduos obesos com ou sem DM2 apresentam redução na atividade da AMPK no músculo esquelético. Entretanto, com a aplicação do TFA, observa-se restauração da atividade da AMPK no músculo esquelético, contribuindo diretamente para o tratamento da obesidade e do DM2 (BUENO JUNIOR *et al.*, 2012; DAY *et al.*, 2017). O TFA também exerce efeitos sobre o SRA, promovendo redução na ativação da alça ECA/Ang II/AT1 sistêmica e em alguns tecidos, tais como o coração (SILVA *et al.*, 2017) e o fígado (FRANTZ *et al.*, 2017). Além disso, o TFA induz aumento da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no coração (FERNANDES *et al.*, 2011), no fígado (FRANTZ *et al.*, 2017) e no

músculo esquelético (FRANTZ *et al.*, 2018). Apesar de a existência de estudos mostrando que o TFA é capaz de modular a atividade da proteína AMPK e do SRA em diversos tecidos, pouco se sabe sobre esse efeito no rim. Neste contexto, novos estudos se fazem necessários para avaliar as repercussões do TFA no rim, e a contribuição da proteína AMPK e das alças do SRA para a prevenção de danos morfofuncionais renais.

Diante do exposto, a investigação proposta foi baseada na identificação de lacunas de conhecimento a partir das seguintes perguntas: 1) O TFA é capaz de prevenir danos renais associados às disfunções metabólicas?; 2) A via da proteína AMPK participa das respostas renais ao TFA?; 3) Qual o efeito do TFA sobre os eixos do SRA no rim?; 4) A redução da alça ECA/Ang II/AT1 e/ou o aumento da alça ECA2/Ang 1-7/Mas junto com a ativação AMPK são os mecanismos pelos quais o TFA previne o desenvolvimento de danos renais?

2. Revisão de literatura

2.1 Obesidade, resistência à insulina e danos renais

Evidências sugerem que a prevalência de sobrepeso e da obesidade tem aumentado em taxas alarmantes, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, sendo considerado um problema de saúde mundial. Segundo a OMS, mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais tinham excesso de peso em 2016. Destes, mais de 650 milhões de adultos eram obesos. Esses dados equivalem a 13% da população adulta do mundo (11% dos homens e 15% das mulheres). Além disso, a prevalência mundial da obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016 (OMS, 2018). No Brasil, de acordo com os dados recentemente publicados pelo Ministério da Saúde (VIGITEL, 2017), 53,8% da população brasileira está acima do peso sendo que 18,9% apresenta obesidade.

A associação entre obesidade e DM2 é conhecida de longa data (HILL *et al.*, 1992; FLATT, 1995), e segundo De Paula (2006), a maioria dos pacientes obesos apresenta resistência à insulina (RI), podendo ou não desenvolver DM2. A RI caracteriza-se pelo estado de reduzida sensibilidade dos efeitos

biológicos da insulina em órgãos alvo (TETA *et al.*, 2015), e por mais de 3 décadas, tem sido reconhecida como fator importante para o desenvolvimento da DRC. Sabe-se que a RI é prevalente em indivíduos com DRC, independentemente do desenvolvimento de DM2 ou do tipo de nefropatia apresentada (TETA *et al.*, 2015).

Um estudo com humanos demonstrou que a redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) associa-se com sinais típicos de RI, tais como reduzida sensibilidade à insulina e alterações na curva glicêmica obtida no teste de tolerância à glicose (PHAN *et al.*, 2012). O início da DRC se dá com o aumento do RFG, da pressão intraglomerular, hipertrofia glomerular e microalbuminúria. No entanto, com a progressão da doença, o aumento do RFG e o aumento da pressão sistólica levam ao agravamento do quadro resultando em proteinúria, glomeruloesclerose e lesão tubular. Os danos renais progressivos culminam com o declínio do RFG, e com o passar do tempo, a doença renal terminal (MARIC-BILKAN, 2013).

A hiperglicemia é essencial para o desenvolvimento de lesões glomerulares observadas na nefropatia diabética (ND) (SALGADO *et al.*, 2004; EKINCI *et al.*, 2013), que por sua vez, é uma das principais causas de insuficiência renal (LAGRANHA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2011). A hiperglicemia induz hiperfiltração glomerular, hipertensão, diurese osmótica e proteinúria (BARDOUX *et al.*, 1999; EKINCI *et al.*, 2013).

Interessante observar que o aumento da adiposidade corporal pode ser determinante para o desenvolvimento de danos renais, pois de acordo com o estudo de Gross (2003), pacientes com elevado IMC apresentam intolerância à glicose e RI acompanhadas de alterações precoces na função renal, tais como hiperfiltração glomerular e microalbuminúria. Essa relação entre obesidade e injúria renal está bem estabelecida no estudo de Henegar *et al.* (2001), no qual cachorros alimentados com dieta hiperlipídica durante 7, 9 ou 24 semanas apresentaram aumento do RFG e do fluxo plasmático renal, aumento da pressão arterial e da atividade da renina, expansão da cápsula de Bowman, aumento da proliferação celular, expansão na matriz mesangial e aumento na expressão de TGF- β (fator de transformação do crescimento). Além disso,

Zhao *et al.* (2011) demonstraram aumento da expressão glomerular da molécula Kim-1 (molécula de injúria renal 1) em animais obesos e diabéticos, a qual tem sido utilizada como marcadora de lesão renal (BONVENTRE, 2009).

Considerando que os rins são órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase através da eliminação de metabólitos resultantes do metabolismo, da regulação do volume plasmático, da composição dos líquidos corporais e da pressão arterial, prejuízos estruturais e funcionais renais podem levar ao comprometimento de todos os outros órgãos e à falência do organismo (BASTOS *et al.*, 2004; GUYTON & HALL, 2006). Nesse sentido, estudar os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento e progressão dos danos renais, bem como as estratégias de prevenção, é fundamental para reduzir as complicações renais associadas à obesidade e à RI

2.2 Mecanismos celulares responsáveis pelos danos renais

O acúmulo de lipídeos nos rins tem sido fortemente associado com o desenvolvimento dos danos celulares renais na presença de obesidade, RI e DM2 (KEANE, 2000; WANG *et al.*, 2005). Sun *et al.* (2002) demonstraram acúmulo de lipídeos no rim de animais com diabetes induzido por streptozotocina (STZ), mesmo sem qualquer alteração nas concentrações de colesterol e triglicérides séricos. Segundo o estudo, o aumento no depósito de lipídeos foi resultante da maior expressão do fator de transcrição SREBP-1c (Proteína Ligante ao Elemento Regulado por Esteróide 1-c), responsável por regular a síntese de ácidos graxos e triglicérides via atividade das enzimas lipogênicas ACC (Acetil-CoA Carboxilase) e FAS (Ácido Graxo Sintase). A ativação do SREBP-1c renal também é responsável pelo aumento da expressão de TGF- β e VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), aumento de proteínas de matriz extracelular como colágeno IV e fibronectina, as quais são importantes marcadoras de fibrose, e redução da expressão de nefrina (ISHIGAKI *et al.*, 2007; SOETIKNO *et al.*, 2013). Coletivamente, essas adaptações morfofuncionais resultam em glomeruloesclerose e proteinúria, participando ativamente do desenvolvimento da ND (SUN *et al.*, 2002).

A contribuição do TAB (tecido adiposo branco) para o desenvolvimento de danos renais tem sido constantemente abordada na literatura, pois grande parte dos lipídeos depositados no rim, na presença de RI e DM2, é oriundo do TAB. Isso porque, em indivíduos e roedores obesos e diabéticos, observa-se aumento crônico da atividade lipolítica do TAB e da disponibilidade de ácidos graxos na circulação (DELARUE & MAGNAN, 2007; JOCKEN & BLAAK, 2008), os quais não apenas serão reesterificados em gotículas de lipídeos no próprio TAB, mas também serão depositados em outros órgãos, como fígado, músculo esquelético e rim, gerando lipotoxicidade, inflamação, estresse oxidativo e efeitos funcionais deletérios (GRUNDY, 2016). De fato, em um estudo prévio do nosso grupo em animais com RI induzida por dieta de cafeteria, observamos aumento na atividade lipolítica, aumento de ácidos graxos circulantes e aumento na expressão proteica da DGAT2 (diacilglicerol transferase 2) no TAB, uma proteína chave da lipogênese (HIGA *et al.*, 2014). Além disso, em outro estudo ainda não publicado, o nosso grupo observou redução na atividade de enzimas oxidativas no músculo esquelético no mesmo modelo experimental. Possivelmente, a ativação dessa sequência de eventos metabólicos no TAB associados aos prejuízos na capacidade oxidativa do músculo esquelético sejam responsáveis por mediar, em parte, o desenvolvimento de complicações em órgãos-alvos associadas à RI.

O TAB, além de constituir o principal reservatório energético, exerce importante função ao atuar como um órgão endócrino dinâmico envolvido em processos fisiológicos e patológicos do organismo (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Nesse sentido, o TAB também pode contribuir para o desenvolvimento de danos renais através da secreção de citocinas inflamatórias e adipocinas que prejudicam a sinalização da insulina. Estudos mostraram associação direta entre obesidade, inflamação e DRC (RAMKUMAR *et al.*, 2004; WAHBA & MAK, 2007). A adiponectina, uma adipocina secretada pelo TAB com papel fundamental para a homeostasia glicêmica, sensibilidade à insulina e ação anti-inflamatória (SHARMA *et al.*, 2008; CUMMINGS *et al.*, 2011; XITA & TSATSOUKIS, 2012), pode exercer efeito protetor contra danos renais através da inibição da produção de espécies reativas de oxigênio, via interação com o receptor AdipoR1 em podócitos (IX & SHARMA, 2010). No entanto, indivíduos

obesos apresentam diminuição na produção de adiponectina (FANTUZZI, 2013), e estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de danos renais (IX & SHARMA, 2010). No nosso estudo prévio com animais com RI, observamos redução significativa da adiponectina circulante associada ao aumento da adiposidade corporal (HIGA, *et al.*, 2014). No entanto, pouco se sabia sobre a repercussão da redução de adiponectina para a função renal nesse modelo experimental.

A Figura 1 ilustra de forma resumida as repercussões morfofuncionais renais decorrentes das alterações metabólicas presente na obesidade e na RI. Pode-se observar que o aumento da disponibilidade de ácidos graxos observado na obesidade e na RI favorece a deposição lipídica renal, a qual será precursora de alterações morfofuncionais envolvidas no desenvolvimento de DRC.

Figura 1: Deposição lipídica intra-renal e repercussões morfofuncionais para os rins.

As ações da adiponectina em tecido renal podem ser mediadas pela proteína AMPK. A AMPK é uma molécula heterotrimérica que contém uma subunidade catalítica (α), com duas isoformas ($\alpha1$ e $\alpha2$), e duas subunidades

regulatórias (β e γ), com as seguintes isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$). Sua ativação é feita através da fosforilação do resíduo de treonina 172, localizado no sítio de ativação do domínio catalítico da subunidade α (TOWLER & HARDIE, 2007; MUSI *et al.*, 2005). Quando fosforilada, a AMPK ativa vias que aumentam a síntese de ATP, como a glicólise e oxidação de ácidos graxos. Por ter uma importante ação intracelular na regulação do metabolismo energético, a AMPK tornou-se um grande alvo de estudo sobre prevenção e tratamento da RI e diabetes.

A AMPK regula a atividade de outras proteínas como a FOXO (família de fatores de transcrição importantes na regulação de processos metabólicos), NF- κ B (fator nuclear- κ B), importante regulador do sistema imune inato e inflamação, PGC1- α (coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma), PPAR α (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa) e SREBP, todas integrantes de vias de sinalização associadas à inflamação e à metabolização lipídica. Um estudo demonstrou que ativação da AMPK através da administração de resveratrol, reduziu a lipotoxicidade, a apoptose e o estresse oxidativo presentes na ND através da ativação do PGC1- α (KIM *et al.*, 2013). Por outro lado, segundo Kim *et al.* (2013), animais obesos e diabéticos apresentam redução na expressão da AMPK no rim, o que por sua vez favorece o acúmulo de lipídeos, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. A Figura 2 ilustra possíveis mecanismos celulares que estão envolvidos no aumento da deposição lipídica a partir da redução da atividade da AMPK. É possível que a redução na AMPK provoque diminuição na expressão de proteínas envolvidas na oxidação de lipídeos, tais como PGC1- α e ACC fosforilada (forma inativa, a qual reduz a síntese de malonil-CoA e consequentemente, a inibição da CPT1). Além disso, ao interagir com a proteína SIRT-1 (Sirtuína 1), a redução da AMPK favorece a lipogênese através do bloqueio do efeito inibidor do SREBP-1.

Figura 2: Aumento da deposição lipídica decorrente de prejuízo na sinalização da via da proteína AMPK.

O desenvolvimento de danos renais associados às doenças metabólicas também podem ser decorrentes da ativação do SRA, e as razões pelas quais podemos estabelecer a participação do SRA neste processo estão evidentes na literatura. Primeiro, porque se sabe que o TAB sintetiza e secreta os componentes do SRA, e que na presença de obesidade, a secreção pode estar aumentada (MUÑOZ *et al.*, 2010; TABONY *et al.*, 2011; BAILEY *et al.*, 2013). Segundo, porque a Ang II, que é uma das principais proteínas ativas do SRA, induz estresse oxidativo, inflamação e produção de TGF- β 1. Esses efeitos resultam em perda de podócitos, glomeruloesclerose e fibrose (WOLF *et al.*, 2007). E, terceiro, porque o uso de inibidores e bloqueadores da alça ECA/Ang II/ AT1 tem sido recomendado para prevenir ou atenuar os efeitos deletérios do DM2 através da melhora da função renal (NIELSEN *et al.*, 2009; CULVER *et al.*, 2017).

O SRA foi descoberto há mais de cem anos, entretanto o papel para a patogênese da hipertensão e na disfunção renal ganhou importância apenas nas últimas décadas (SANTOS *et al.*, 2012). Segundo a literatura, o SRA é uma cascata coordenada de proteínas e hormônios peptídicos, reconhecido como um poderoso determinante da homeostase e da hemodinâmica cardiovascular, e desempenha papel fundamental na regulação da pressão

arterial e no balanço de fluidos e eletrólitos (INAGAMI *et al.*, 1994; OIGMAN & NEVES, 2000). A renina é preferencialmente sintetizada no aparelho justaglomerular, enquanto o angiotensinogênio é sintetizado no fígado. Segundo a visão clássica do SRA, a Ang II (substância efetora fundamental) é derivada da reação catalítica da renina em seu substrato (angiotensinogênio). Esta reação dá origem a um peptídeo intermediário, a Ang I, que será clivado pela ECA no pulmão, dando origem a Ang II. A ECA é uma dipeptidase que funciona clivando 2 aminoácidos do C-terminal da Ang I (precursor inativo) (OIGMAN & NEVES, 2000). Os componentes do SRA também foram localizados em diversos órgãos, dentre os quais, os rins. O angiotensinogênio, a ECA e os receptores angiotensinérgicos estão localizados em diversas porções do néfron. Também foram encontrados maiores níveis de Ang I, Ang II, Ang 1-7 e Ang 1-9 no tecido renal comparado aos níveis circulantes, sugerindo que o SRA possui importante contribuição para ajustes renais intrínsecos (SANTOS *et al.*, 1996).

Evidências na literatura já demonstraram que a alça ECA/Ang II/AT1 pode regular a atividade da AMPK. Por exemplo, Tabony *et al.* (2011) mostraram que a Ang II induz danos metabólicos significativos e perda de massa muscular via inativação da AMPK. Além disso, a Ang II inativa o PGC1- α e reduz a fosforilação da ACC. A ACC na forma ativa (desfosforilada) promove maior síntese de malonil-CoA, o qual atua inibindo a atividade da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1), uma importante proteína transportadora de ácido graxo na mitocôndria. Já no fígado, o uso do bloqueador do receptor AT1 (Candesartan) aumenta a atividade da AMPK em animais controles, melhorando a condição metabólica tecidual (RIBEIRO-OLIVEIRA *et al.*, 2013). No entanto, no rim, a relação entre SRA e AMPK e as possíveis repercussões para a morfologia e função renal são desconhecidas.

Além da visão clássica, o SRA também apresenta vias alternativas. Uma delas é mediada por uma enzima denominada quimase, a qual converte o angiotensinogênio em Ang II independente do eixo renina/ECA (OIGMAN & NEVES, 2000; KALUPAHANA & MOUSTAID-MOUSSA, 2012). A via alternativa também pode dar origem a outros metabólitos, como por exemplo, a Ang 1-7.

Esta é formada através da ação da enzima conversora de Ang II (ECA2), cujos efeitos se fazem através do receptor Mas. A Ang 1-7 é vasodilatadora e anti-hipertensiva, com características contrarreguladoras das ações da Ang II (SANJULIANI *et al.*, 2011). Além disso, previne a produção de TGF- β 1 induzida pela Ang II no túbulo proximal, porém estimula a produção de fibronectina, colágeno IV e TGF- β 1 em células mesangiais glomerulares (SU *et al.*, 2006). Zheng *et al.* (2015) demonstraram que a infusão de Ang 1-7 previne a deposição lipídica renal, o aumento do colesterol total no tecido renal, o aumento da expressão do SREBP-2, o aumento da expressão de fatores inflamatórios e a lesão tubular renal em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Esses dados revelam a complexidade da ação da Ang 1-7 no tecido renal, e indicam a necessidade de novos estudos para o melhor entendimento.

Considerando que o acúmulo de lipídeos no rim pode ser um dos pontos de partida da lesão renal na obesidade e no diabetes, e que o SRA e a AMPK podem estar envolvidos nesse processo, é possível que o balanço das alças ECA/Ang II/ e AT1 ECA2/Ang 1-7/Mas junto com a ação da AMPK participem do desenvolvimento dos danos renais associados aos distúrbios metabólicos. A Figura 3 resume os componentes do SRA, a interação com a AMPK e possíveis repercussões para os rins.

Figura 3: Representação do SRA e interação com a via da AMPK.

2.3 Efeitos do treinamento físico aeróbio

O TFA exerce efeitos benéficos em parâmetros como glicemia, perfil lipídico e composição corporal (LEHNIG & STANFORD, 2018; WINNICK *et al.*, 2008; DINCER *et al.*, 2016). Evidências na literatura mostraram que o TFA melhora a glicemia de indivíduos diabéticos, principalmente através do aumento na sensibilidade à insulina (WINNICK *et al.*, 2008; DINCER *et al.*, 2016), aumento da expressão de receptor de insulina e de transportador de glicose GLUT4 (RICHTER & HARGREAVES, 2013) e também através da redução dos níveis de hemoglobina glicada (UMPIERRE *et al.*, 2011).

Segundo Johansen (2005), intervenções terapêuticas e especialmente farmacológicas são capazes de melhorar as complicações causadas pela DRC, entretanto, o TFA é uma possibilidade de intervenção não farmacológica muito importante para o tratamento de pessoas com quadro de lesão renal. Um estudo prévio demonstrou que o TFA diminuiu a proteinúria de animais com DM1 induzido pela STZ (SILVA *et al.*, 2012). Agarwal *et al.* (2012) demonstraram que o TFA de intensidade moderada induz efeitos morfofuncionais benéficos para o rim. Esses achados foram observados em ratos espontaneamente hipertensos, os quais apresentaram diminuição do

estresse oxidativo, da inflamação e da ativação do SRA. Entretanto, pouco se sabe sobre as repercussões do TFA para função e estrutura renal resultantes de alterações metabólicas induzidas por dieta de cafeteria.

Além de promover a melhora no metabolismo glicêmico, o TFA também tem sido apontado como uma importante ferramenta para a prevenção da obesidade, reduzindo ou pelo menos mantendo o peso corporal através do aumento do gasto energético, e desta forma atuando também na prevenção contra os efeitos deletérios resultantes do aumento do TAB (HUNTER *et al.*, 2010; HIGA *et al.*, 2014). Parte das adaptações induzidas pelo TFA é mediada pela ativação da proteína AMPK, a qual é responsável por fosforilar a proteína ACC e ativar a PGC1- α , e por consequência, melhorar a oxidação de lipídeos em tecidos muscular, hepático e adiposo (IX & SHARMA, 2010). Além disso, o PGC1- α também pode ser regulado pela proteína SIRT-1, a qual exerce ações semelhantes à AMPK que disparam a ativação de proteínas envolvidas no metabolismo energético. No mais, a SIRT-1 quando ativada, pode inibir o SREBP-1, e conseqüentemente, a ativação de genes relacionados com a lipogênese (Figura 4). Sabe-se que indivíduos obesos com ou sem DM2 apresentam redução na atividade da AMPK no músculo esquelético, entretanto, com a aplicação do TFA, observa-se restauração da atividade da AMPK e melhora do quadro metabólico (SRIWIJITKAMOL *et al.*, 2007; BUENO JUNIOR *et al.*, 2012).

O TFA também pode prevenir distúrbios metabólicos através da ação sobre o SRA, pois é capaz de reduzir as concentrações de ECA e Ang II e, aumentar as concentrações de ECA2 e Ang 1-7, pelo menos no coração de ratos espontaneamente hipertensos (SILVA *et al.*, 2017). Frantz *et al.* (2017) observaram aumento na ECA2 e Ang 1-7 no músculo esquelético de ratos treinados, e Silva *et al.* (2017) demonstraram aumento de Ang 1-7 sistêmica em ratos espontaneamente hipertensos e treinados. Enquanto o desbalanço entre as vias clássica e não clássica do SRA pode estar associado à indução de vias que levam à diminuição da oxidação lipídica, a prevenção deste desbalanço pelo TFA, seja através da redução da Ang II e/ou do aumento da Ang 1-7, poderia contribuir para a ativação da AMPK, e portanto, para a

melhora da oxidação lipídica (Figura 4). Esses dados revelam a potencialidade do TFA em modular o SRA, e oferecem pistas para desvendarmos os mecanismos celulares acionados pelo TFA para prevenção de doenças metabólicas e danos renais associados. No entanto, é importante ressaltar a grande escassez de estudos sobre os efeitos do TFA para a morfologia e função renal, bem como de estudos sobre mecanismos celulares de prevenção e tratamento de doenças renais por meio do TFA.

Figura 4: Efeitos celulares do TFA para a prevenção de deposição lipídica intra-renal.

Considerando a fundamentação teórica exposta previamente e as lacunas de conhecimento existentes, o presente estudo foi delineado para testar a hipótese de que o TFA previne o desenvolvimento de danos renais associados à obesidade e à RI, e que essa resposta pode ser mediada pela modulação dos componentes do SRA em conjunto com a ativação da AMPK renal.

3. Objetivos

3.1 Gerais

Avaliar o potencial do TFA para a prevenção de danos renais induzidos por dieta de cafeteria, e a participação do SRA e da proteína AMPK nessa resposta.

3.2 Específicos

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

- Os parâmetros metabólicos, tais como peso corporal e de tecidos, consumo hídrico e alimentar, glicemia basal e curvas glicêmicas;
- A função renal;
- A expressão gênica e proteica de marcadores do metabolismo lipídico nos rins;
- A morfologia, o perfil inflamatório e a fibrose do tecido renal;
- Os componentes do SRA em sangue e tecido renal.

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=13 animais/grupo), de acordo com o tipo de tratamento (sedentário ou treinado) e de dieta (normocalórica ou de cafeteria): 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 24°C 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 018/14.

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 (Nestlé®), 15g da ração convencional triturada (NUVLAB®), 10g de amendoim torrado triturado (Santa Helena), 5g de bolacha de maisena triturada (Triunfo®) e 5g de açúcar refinado (União®) (HIGA *et al.*, 2014b) Como controle, foi utilizada a ração industrializada padrão (Nuvilab®, Paraná, Brasil).

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

Dietas	Carboidrato	Proteína	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, que foi mensurada durante o teste de esforço físico máximo. A duração foi aumentada progressivamente, 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 esquemática do TFA.

4.4. Desenho experimental

Antes do início do protocolo experimental, todos os animais foram submetidos ao teste de esforço físico máximo. Em seguida, o TFA e a administração da dieta de cafeteria foram iniciados simultaneamente. Na quarta semana do protocolo experimental, os grupos treinados (TF-NO e TF-CAF) foram submetidos novamente ao teste de esforço físico máximo para ajuste da intensidade do TFA. Ao longo do protocolo experimental, o peso corporal foi

avaliado semanalmente. No final da sexta semana, os animais foram submetidos à gaiola metabólica. No final da sétima semana do protocolo experimental, todos os animais foram submetidos aos testes de tolerância à glicose e de tolerância à insulina. No final da oitava semana, todos os animais foram submetidos ao teste de esforço físico máximo. Quarenta e oito horas após a última sessão de exercício, das quais 8 horas finais em jejum, os animais foram submetidos ao procedimento de morte (Figura 6).

Figura 6: Representação esquemática do desenho experimental. Dieta e TFA foram iniciados simultaneamente e tiveram duração de 8 semana.

4.5. Teste de esforço físico máximo

A capacidade de execução de TFA foi avaliada antes, na semana 4 e após o TFA através de um teste progressivo escalonado em esteira rolante, sem inclinação até a exaustão (FERREIRA *et al.*, 2007). A velocidade inicial da esteira foi de 0,4 km/h, e a cada três minutos, a velocidade da esteira 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.

4.6. Determinação do peso corporal

Ao longo de todo protocolo experimental, o peso corporal foi avaliado 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).

4.7. Gaiola metabólica

Na sexta semana de protocolo experimental, todos os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, nas quais permaneceram por 24 horas para adaptação ao ambiente. Nas 24 horas seguintes, foram mensurados o volume urinário, o consumo de água e de ração, e a urina foi coletada para a quantificação, de creatinina, proteínas totais e ureia através de ensaio colorimétrico (Kit bioquímico, LABTEST), utilizando espectrofotometria de luz visível. Além disso, foram quantificados os eletrólitos (Na^+ , K^+ e Cl^-) através do uso do aparelho de gasometria (ABL 800 Flex, Dinamarca) e osmolaridade através do uso de osmômetro (Vapor Pressure Osmometer 5520 USA). O *clearance* de creatinina para avaliação do ritmo de filtração glomerular foi calculado através da fórmula $([\text{Creatinina}] \text{ Urina} \times \text{Volume Urina}) / [\text{Creatinina}] \text{ Soro}$. Por fim, foi calculado o coeficiente metabólico através da razão do ganho de peso pela quantidade de ração ingerida.

4.8 Avaliações glicêmicas

As avaliações glicêmicas foram realizadas com auxílio de tiras reativas e glicosímetro (AccuChek Advantage Roche Diagnostics®). A glicemia de jejum (8h) foi avaliada 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 48h do TTG. Para isso, a curva glicêmica foi determinada em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal),

5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a administração intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg peso corporal; Novo Nordisk®, Paraná, Brasil). 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).

4.9 Coleta de sangue e tecidos

Ao final do protocolo experimental, após 8 horas de jejum, os animais foram anestesiados por injeção i.p. de pentobarbital (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. Em seguida, os rins, as glândulas adrenais e o TAB retroperitoneal foram coletados e pesados. O sangue foi centrifugado a 4°C, 12000 rpm por 10 minutos, e o soro armazenado em freezer a -80°C para a dosagem da creatinina através de kit bioquímico (LABTEST).

4.10. Expressão gênica

O RNA total foi extraído do rim 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) seguindo as instruções do fabricante. Os *primers* utilizados para amplificação dos genes alvos e de referência 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 Sequence Detection System (Applied Biosystems, 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 (ciclofilina). Os níveis de expressão gênica são dados por $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT$ é o valor de ΔCT subtraído do ΔCT do grupo controle.

Tabela 2: *Primers* para amplificação dos genes

Gene	Sequência
SREBP-1	Foward: 5'-GATCGCAGTCTGAGGAGGAG-3' Reverse: 5'-GATAGCAGGATGCCAACAGC-3'
SREBP-2	Foward: 5'-TCCTGCATGAAGCCACTGT-3' Reverse: 5'-AGTAGCTCGCTCTCGTTGG-3'
Ciclofilina	Foward: 5'-AATGCGGACCAAACACAAA-3' Reverse: 5'-CCTTCTTTCACCTTCCCAA-3'

4.11. Quantificação proteica

Para este ensaio, amostras de rim foram homogeneizadas em tampão de extração na proporção 1,5 ml para cada 75mg de rim. O tampão utilizado apresentava pH: 7,2, contendo 0,1M de fosfato de sódio monobásico, 0,34M de sacarose, 0,3M de cloreto de sódio e coquetel de inibidor de protease Mini Complete sem EDTA (Roche®, Germany). As amostras foram centrifugadas a 14000 g por 25 minutos a 4°C. Parte do sobrenadante foi utilizada para determinar a concentração de proteína pelo kit de ensaio proteico BCA (PIERCE Biotechnology) e a outra parte armazenada a -80°C para posteriores análises por *Western Blot*. Os anticorpos primários utilizados foram anti-AMPK,

anti-p-AMPK, anti-SIRT-1, anti-PGC1- α , anti-ACC, anti-p-ACC (Cell signaling, USA), anti-Mas (ABCAM, USA), anti-TNF- α (ABCAM, USA), anti-AT2 (ABCAM, USA), anti-IL-6 (ABCAM, USA), anti-TGF- β (Santa-Cruz, USA), 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 leite desnatado 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 Life science®). A intensidade de banda foi quantificada no programa Image J (versão 1.43 para Windows).

4.12. Dosagem da atividade das enzimas citrato sintase e β -HAD

Para a dosagem das enzimas citrato sintase e β -HAD (β -hidroxiacil-CoA desidrogenase), aproximadamente 0,75g do rim foi suspenso em 750 μ l de tampão de extração contendo Tris- base (50mM) e EDTA (1mM), pH=7,4. O material foi homogeneizado em Precellys®24 (Bertin Corp, USA) por 2 ciclos de 20 segundos em velocidade máxima. O homogenato foi centrifugado a 3000 rpm, por 15 minutos, a 4°C em centrífuga 5417 C/R (Eppendorf). Em seguida, o sobrenadante foi retirado para a dosagem da atividade das enzimas, através de ensaio colorimétrico realizado em espectrofotômetro.

A atividade da citrato sintase foi medida a partir da quantificação do complexo formado entre a Coenzima A (CoA) liberada com o DTNB do meio e oxaloacetato. O tampão utilizado no ensaio consistiu em Tris-aminometano (50mM), EDTA (1mM) e DTNB (0,2mM), pH=8,1, Acetil CoA (0,1mM) foi misturada com 1ml de Triton X 1% e 10ml de tampão de ensaio, constituindo a mistura de ensaio. A reação foi iniciada com a adição de 15 μ L de ácido oxaloacético (0,5mM) ao extrato enzimático, e acompanhada por 10 minutos (25°C). A absorbância foi monitorada a 412nm (ALP *et al.*, 1976).

A atividade da β -HAD foi medida a partir da determinação da quantidade de NADPH oxidada considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH. O tampão utilizado no ensaio continha trietanolamina (0,1M), EDTA (5mM) e NADH (0,45mM), pH=7,0. A reação foi iniciada com a adição de 15 μ L

AcetoAcetil CoA (0,1mM) ao extrato enzimático, e acompanhada por 10 minutos (37°C). A absorbância foi monitorada a 340nm (BASS *et al.*, 1969).

As proteínas foram quantificadas pelo método BCA™ (PIERCE Biotechnology). Os resultados foram expressos em µg/µl de proteína presente no extrato.

4.13. Histologia

4.13.1 Avaliação da deposição lipídica renal

O rim esquerdo foi seccionado no plano longitudinal, de modo a obter duas partes iguais. Uma parte foi congelada inicialmente em nitrogênio líquido e, em seguida, mantida em freezer com temperatura a -80°C. O tecido foi preso a um pedaço de papel com o auxílio de resina (Tissue Tek) e cortado em criostato (MICROM – HM505E), com espessura de 8 µm. Em seguida, foi realizada a coloração com Oil Red O (Sigma Aldrich), a fim de verificar a deposição de gotículas de gordura no glomérulo e nos túbulos intersticiais. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina para a visualização dos núcleos, possibilitando uma melhor dimensão dos limites celulares. Foram obtidas 10 fotos digitalizadas por lâminas, com aumento de 200X (Programa Leica Q Win Plus, V. 3.5.1), as quais foram analisadas em microscópio óptico (Leica DMLS) e quantificadas no programa Image Pro-Plus 4.1. A quantidade de lipídeos no tecido foi apresentada como porcentagem de lipídeos por área de tecido.

4.13.2 Morfometria glomerular

A outra parte do rim esquerdo foi conservada 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 de tecido renal com 5 µm de espessura foram corados com Picro-Sirius Red. O estudo dos parâmetros morfológicos foi realizado por meio de microscopia óptica com o auxílio do programa Image

Pro-Plus 4.1, no aumento de 400X. As variáveis histo-morfológicas (diâmetro, área do tufo glomerular, área da cápsula glomerular e área do espaço de Bowman) foram obtidas a partir da mensuração de 30 glomérulos por rim. Cada glomérulo foi definido pela visualização do polo vascular e urinário. O dado de cada animal foi representado pela média dos 30 glomérulos.

4.13.3 Avaliação da deposição de colágeno

O colágeno foi avaliado nas lâminas coradas com Picro-Sirius Red através do programa Image Pro-Plus 4.1. Foram feitas duas avaliações, sendo a primeira do colágeno total por área e a segunda do conteúdo de colágeno glomerular. Os resultados foram obtidos a partir da média de 30 fotos por lâmina, no aumento de 400x. Os resultados foram apresentados como porcentagem de colágeno por área.

4.14. Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica, foram realizados cortes de blocos de parafina a 4 μ m. Foi feita a recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0. Posteriormente, os cortes foram incubados por 1 hora com anticorpos primários anti-TGF- β , anti-colágeno IV e anti-fibronectina. Para reconhecimento dos anticorpos primários e amplificação do sinal, os cortes foram incubados com polímero HRP (Nichirei) por 30 minutos. Por fim, os cortes foram revelados por solução cromógena de diaminobenzidina (Sigma Chemical CO USA) e contra-corados com hematoxilina. As lâminas foram montadas em Permount® (Fisher Scientific NJ USA) e analisadas através de microscopia óptica. Foram feitas 10 fotos por lâmina em aumento de 200X e a quantidade de cada proteína foi determinada como porcentagem de proteínas por área de tecido.

4.15. Atividade das enzimas ECA e ECA2

As atividades das enzimas ECA e ECA2 foram realizadas em soro e amostras de tecido renal 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 de ZnCl₂ pH 7,0. A atividade enzimática foi determinada medindo-se a fluorescência por 20 minutos (uma leitura por minuto). A atividade foi expressa em UF.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína tecidual, ou em UF.min⁻¹.ml⁻¹ de soro.

A atividade da ECA2 foi realizada utilizando o peptídeo Abz-APK(Dnp)-OH em 0,2M de tampão Tris-HCl, 200mM de NaCl, pH 7,5. A atividade enzimática foi determinada medindo-se a fluorescência por 20 minutos (uma leitura por minuto), e foi expressa em UF.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína tecidual ou em UF.min⁻¹.ml⁻¹ de soro.

4.16 Quantificação das angiotensinas

Os níveis de Ang II e Ang 1-7 foram avaliados no rim por meio de ELISA utilizando kits comerciais (Biomatik), de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.17. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ 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 Bonferroni. Em todos os casos foi adotado nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada através do software STATISTIC 6,0.

5. Resultados

5.1. Capacidade física

Não houve diferença na velocidade máxima atingida no teste de esforço realizado antes do início do protocolo experimental entre os grupos (Figura 7). Já no teste de esforço realizado no final da oitava semana de protocolo experimental, os grupos TF-NO e TF-CAF aumentaram a velocidade máxima atingida comparada aos grupos SED-NO e SED-CAF, confirmando que o TFA aumentou a capacidade física dos animais treinados (Figura 8). Esse resultado sinaliza que o TFA foi eficaz para promover adaptação tipicamente aeróbia.

Figura 7: Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico realizado pré-TFA (n=10/grupo)

Figura 8: Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico pós-TFA. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO e SED-CAF (n=10/grupo).

5.2. Peso corporal e peso dos rins

Não houve diferença estatística no peso corporal inicial entre os grupos (Figura 9). No entanto, pode-se observar que a partir da 3ª semana até o final da 8ª semana, ambos os grupos treinados apresentaram peso corporal menor comparado aos grupos sedentários.

Figura 9: Evolução do peso corporal. * $p \leq 0,05$ TF-NO e TF-CAF vs. SED-NO e SED-CAF ($n=10/\text{grupo}$).

Quando avaliamos a ganho de peso corporal, ou seja, a diferença entre o peso corporal inicial e o peso corporal final, observamos que ambos os grupos treinados apresentaram menor ganho de peso comparados aos grupos sedentários (Figura 10). Não houve diferença estatística no peso de rins e glândulas adrenais nos grupos estudados, porém o peso do depósito de TAB-RP foi maior no grupo SED-CAF comparado aos demais grupos (Tabela 3).

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

Tabela 3: Peso de rins e tecidos normalizados pelo peso corporal dos animais.

	SED-NO (n=10)	TF-NO (n=10)	SED-CAF (n=10)	TF-CAF (n=10)
Rins (g)	0,010±0,0013	0,012±0,0002	0,011±0,0002	0,011±0,0002
Adrenais (g)	0,0066±0,0008	0,0066±0,0007	0,0065±0,00014	0,007±0,00018
TAB-RP	0,002 ± 0,0004	0,001 ± 0,0002	0,004 ± 0,0005*	0,002 ± 0,0001
Peso corporal (g)	26,15±0,6	24,5±0,7	26,7±0,3	24,6±0,5

* $p \leq 0,05$ TF-NO, SED-CAF e TF-CAF.

5.3 Respostas metabólicas

Conforme demonstrado na Figura 11, a ingestão hídrica dos grupos SED-CAF e TF-CAF foi menor comparado aos grupos SED-NO e TF-NO.

Figura 11: Consumo hídrico em gaiola metabólica durante 24 horas. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO, e TF-NO ($n=13$ /grupo).

Na avaliação do volume de urina produzido em 24 horas, pode-se observar que os grupos SED-CAF e TF-CAF produziram menor volume urinário em 24 horas comparado aos grupos SED-NO e TF-NO (Figura 12).

Figura 12: Volume de urina coletado em gaiola metabólica durante 24 horas. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO, e TF-NO ($n=13$ /grupo).

Quando analisada a razão entre a quantidade de água ingerida e a quantidade de urina excretada em 24 horas, pode-se observar que não houve diferença entre os grupos (Figura 13).

Figura 13: Razão entre o consumo de água e o volume urinário (n=13/grupo).

O consumo de ração avaliado individualmente em gaiola metabólica na sexta semana de protocolo experimental demonstra que os quatro grupos não apresentaram diferenças na quantidade de ração ingerida em gramas (Figura 14A). Também foi possível observar que não houve diferença no consumo calórico entre os grupos estudados (Figura 14B).

Figura 14: Consumo de ração em gramas (A) e em calorias (B) em gaiola metabólica durante 24 horas (n=13/grupo).

O coeficiente metabólico, calculado a partir da razão entre consumo de ração e a variação de peso corporal, foi maior em ambos os grupos treinados TF-NO e TF-CAF comparado aos grupos SED-NO e SED-CAF (Figura 15).

Figura 15: Coeficiente metabólico dos grupos experimentais. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO e SED-CAF (n=13/grupo).

5.4. Respostas glicêmicas

Os animais SED-CAF apresentaram maior glicemia de jejum comparado aos animais do grupo SED-NO (Figura 16).

Figura 16: Glicemia de jejum. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO (n=13/grupo).

No teste de tolerância à glicose, podemos observar que o grupo SED-CAF apresentou redução da tolerância à glicose, conforme os dados apresentados na curva glicêmica (Figura 17A). O mesmo foi observado através do cálculo da área sob a curva (AUC, Figura 17B), pois o grupo SED-CAF apresentou maior AUC comparado a todos os outros grupos (Figura 17B).

Interessante observar que o TFA preveniu a intolerância à glicose no grupo TF-CAF.

Figura 17: Curva glicêmica (A). Área sob a curva (AUC) do teste de tolerância à glicose (B). * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF ($n=8$ /grupo).

Já no teste de tolerância à insulina, podemos observar que o grupo SED-CAF apresentou maior tempo de decaimento da glicose mesmo na presença da insulina, não atingindo o mesmo nível de glicose que os demais grupos ao final do teste (Figura 18A). O mesmo pode ser evidenciado através do cálculo da constante de decaimento da glicose (k_{ITT}) (Figura 18B). Sendo assim, é possível evidenciar que o grupo SED-CAF apresenta resistência à ação da insulina e que o TFA foi capaz de prevenir essa resistência no grupo TF-CAF.

Figura 18: Curva de decaimento de glicose após a injeção de insulina (A). Constante de decaimento da glicose (Kitt) após a injeção de insulina (B). * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF ($n=10$ /grupo).

5.5. Função renal

Não foram encontradas diferenças estatísticas tanto na concentração de creatinina sérica (Figura 19A) quanto na concentração de creatinina excretada (Figura 19B) em 24 horas entre os grupos. Por outro lado, o grupo SED-CAF apresentou aumento não significativo de 88% no RFG comparado aos demais grupos (Figura 19C).

Figura 19: Creatinina sérica (A); Creatinina excretada (B); Ritmo de filtração glomerular (RFG) (C) (n=10/grupo).

A quantidade de uréia excretada em 24 horas foi menor no grupo TF-CAF comparado ao SED-NO e TF-NO (Figura 20A). Além disso, a concentração de ureia sérica foi menor nos grupos SED-CAF e TF-CAF comparados ao SED-NO e, menor no TF-CAF comparado ao grupo TF-NO (Figura 20B). A quantidade de proteína total excretada não foi diferente nos grupos estudados (Figura 21) bem como não houve diferença no cálculo da razão proteína urinária/creatinina urinária (Figura 22).

Figura 20: Ureia excretada (A). (n=13/grupo); Ureia sérica (B) (n=7/grupo). * $p < 0,05$ vs. SED-NO; # $p \leq 0,05$ vs. TF-NO.

Figura 21: Proteína total excretada (n=13/grupo).

Figura 22: Razão proteína urinária/creatinina urinária (n=13/grupo).

A excreção de potássio (Figura 23) foi menor em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria comparados aos grupos alimentados com dieta normocalórica, no entanto, não houve diferença na excreção de sódio (Figura 24) e cloreto (Figura 25) nos grupos estudados. A osmolaridade urinária estava reduzida também nos grupos alimentados com dieta de cafeteria comparados aos grupos alimentados com dieta normocalórica (Figura 26).

Figura 23: Potássio excretado. * $p < 0,05$ vs. SED-NO e TF-NO (n=9/grupo).

Figura 24: Sódio excretado. (n=9/grupo).

Figura 25: Cloreto excretado (n=9/grupo).

Figura 26: Osmolaridade na urina. * $p < 0,05$ vs. SED-NO e TF-NO ($n=13$ /grupo).

5.6. Deposição lipídica renal

Conforme pode ser observado na Figura 27, a deposição lipídica renal foi significativamente maior no grupo SED-CAF comparado a todos os outros grupos estudados. Durante as observações microscópicas, identificamos que a grande maioria dos lipídeos estava depositada em túbulos, com poucas gotículas depositadas em glomérulos (Figura 28).

Figura 27: Deposição lipídica renal. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF ($n=4$ /grupo).

Figura 28: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais corados com oil red O para a visualização de deposição lipídica. Gotículas lipídicas (seta) no aumento de 200x.

5.7. Resposta morfológica glomerular e fibrose tecidual

Houve redução área da cápsula de Bowman em ambos os grupos treinados comparados aos grupos sedentários (Figura 29).

Figura 29: Área da cápsula de Bowman. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO e TF-NO ($n=10$ /grupo).

Não houve diferença nos parâmetros morfológicos renais de área do tufo glomerular e diâmetro do tufo glomerular (Figura 30 e Figura 31, respectivamente).

Figura 30: Área do tufo glomerular (n=10/grupo).

Figura 31: Diâmetro do tufo glomerular (n=10/grupo).

A área do espaço de Bowman foi reduzida no grupo SED-CAF comparado ao grupo SED-NO (Figura 32). A Figura 33 ilustra fotomicrografias representativas dos cortes histológicos corados com Picrossirius Red utilizados para a análise.

Figura 32: Área do espaço de Bowman. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO (n=10/grupo).

Figura 33: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais coradas com Picrossirus Red, com túbulos (T), glomérulos (G), espaço de Bowman (E), cápsula de Bowman (seta) e tufo glomerular (círculo vermelho). Aumento de 400x.

A fibronectina foi mensurada como marcadora de fibrose renal, e conforme demonstrado na Figura 34, não houve diferença no conteúdo proteico de fibronectina entre os grupos estudados. A Figura 35 apresenta as

fotomicrografias representativas dos cortes histológicos renais com marcação por imunohistoquímica para fibronectina.

Figura 34: Conteúdo de fibronectina nos rins (n=5/grupo).

Figura 35: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais, marcação fibronectina (positiva em marrom), aumento de 200x.

A deposição de colágeno no tecido renal foi utilizada como marcadora de remodelamento tecidual. Para essa análise, utilizamos coloração

picrossirius red para marcação de colágeno tipo I e tipo III. Além disso, avaliamos o conteúdo de colágeno tipo IV com o uso de anticorpo específico. Conforme demonstrado nas Figura 36 e Figura 37, não houve diferença na deposição de colágenos tipo I e II em tecido renal (colágeno total) e também em glomérulo, respectivamente. Além disso, não observamos diferenças na deposição de colágeno tipo IV entre os grupos estudados (Figura 38). A Figura 39 apresenta fotomicrografia representativa dos cortes histológicos renais com marcação por imunohistoquímica para colágeno IV. Pode-se observar nessas imagens que tanto túbulos quanto glomérulos foram marcados. Entretanto, o maior conteúdo marcado encontra-se em glomérulos.

Figura 36: Colágeno Total representado em porcentagem por área (n=5/grupo).

Figura 37: Colágeno Glomerular representado em porcentagem por área de glomérulo. (n=5/grupo).

Figura 38: Conteúdo de Colágeno IV nos rins (n=5/grupo).

Figura 39: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais, marcação Colágeno IV (positiva em marrom), aumento de 200x.

5.8. Perfil inflamatório

Não houve diferença no conteúdo proteico do TGF- β avaliado por imunohistoquímica entre os grupos estudados (Figura 40). A Figura 41 apresenta fotomicrografias representativas dos cortes histológicos renais com marcação por imunohistoquímica para TGF- β . Pode-se observar nessas

imagens que tanto túbulos quanto glomérulos foram marcados. Além disso, a marcação para TGF- β é mais forte que a marcação de fibronectina e colágeno IV apresentadas anteriormente, o que reflete em maior percentual de área marcada de tecido. Para confirmar o resultado encontrado na imunohistoquímica, realizamos a análise de expressão proteica por *Western Blot*, e da mesma maneira não encontramos diferença entre os grupos estudados (Figura 42).

Figura 40: Conteúdo de TGF- β nos rins (n=5/grupo).

Figura 41: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos renais, marcação TGF- β (marcação positiva em marrom), aumento de 200x.]

Figura 42: Expressão proteica de TGF- β (n=5/grupo).

Não houve diferença na expressão proteica da IL-6, entretanto a análise estatística por ANOVA resultou em $p=0,07$ para o fator dieta de cafeteria, o que sugere uma tendência ao aumento da expressão proteica da IL-6 em ambos os grupos submetidos à dieta de cafeteria (SED-CAF e TF-CAF) comparada aos grupos alimentados com dieta normocalórica (SED-NO e TF-NO) (Figura 43).

Figura 43: Expressão proteica de IL-6 (n=4/grupo).

Conforme pode ser observado na Figura 44, houve aumento na expressão proteica do TNF- α em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria (SED-CAF e TF-CAF) comparados aos grupos alimentados com dieta normocalórica (SED-NO e TF-NO).

Figura 44: Expressão proteica de TNF- α . * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO e TF-NO (n=2/grupo).

5.9. Resposta do metabolismo lipídico no tecido renal

A deposição lipídica intra-renal pode ocorrer devido ao desbalanço entre as vias de síntese e oxidação lipídica. Para entender melhor essa dinâmica em nosso modelo experimental, avaliamos a expressão de dois genes que são cofatores de ativação de genes relacionados a síntese de ácidos graxos (SREBP-1) e síntese de colesterol (SREBP-2). Pode-se observar que não houve alteração do SREBP-1 entre os grupos estudados (Figura 45), no entanto, houve aumento do SREBP-2 em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria comparados aos grupos alimentados com dieta normocalórica (Figura 46).

Figura 45: Expressão gênica SREBP-1 (n=5/grupo).

Figura 46: Expressão gênica SREBP-2. *p≤ 0,05 vs. SED-NO e TF-NO (n=5/grupo).

Considerando que a via ativada pela proteína AMPK é fundamental para ativação de processos metabólicos que aumentam a oxidação lipídica, buscamos avaliar proteínas chaves que pudessem explicar, pelo menos em parte, o resultado de deposição lipídica renal deste estudo. Observamos que expressão proteica da AMPK total não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 47A), porém houve aumento significativo na expressão da AMPK fosforilada no grupo TF-CAF (Figura 47B), sem alteração na razão p-AMPK/ t-AMPK (Figura 47C).

Figura 47: Expressão proteica da AMPK total (A), fosforilada (B) e razão p-AMPK/t-AMPK (C). * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO, TF-NO (n=9/grupo).

A AMPK fosforilada (forma ativa) pode regular o balanço entre síntese e oxidação lipídica por meio da ativação do PGC1- α , o qual exerce importante papel na biogênese mitocondrial e aumento na oxidação de lipídeos. Além disso, o PGC1- α também pode ser regulado pela proteína SIRT-1, a qual exerce ações semelhantes à AMPK que disparam a ativação de proteínas envolvidas no metabolismo energético. No nosso estudo, não observamos diferença na expressão proteica da SIRT-1 (Figura 48) tampouco da PGC1- α (Figura 49) no rim.

Outra via de ação da AMPK ocorre através da fosforilação da ACC, tornando-a inativa. Com isso, a formação de Malonil-CoA pode ser reduzida, e consequentemente, a inibição da CPT1 seria menor. Nessa condição, o fluxo de ácidos graxos para dentro da mitocôndria seria favorecido, e portanto, a taxa de oxidação lipídica poderia ser maximizada. Entretanto, os achados revelaram que não houve diferença na expressão proteica da ACC total (Figura 50A), da ACC fosforilada (Figura 50B), bem como da razão p-ACC/t-ACC (Figura 50C) no rim dos grupos estudados.

Figura 48: Expressão proteica da SIRT-1 (n=5/grupo).

Figura 49: Expressão proteica do PGC1-α (n=9/grupo).

Figura 50: Expressão proteica da ACC total (A), fosforilada (B) e razão p-ACC/t-ACC (C) (n=4/grupo).

Além de regular a expressão de proteínas importantes no metabolismo lipídico, a AMPK pode modular diretamente a atividade de enzimas importantes no controle do balanço entre síntese e oxidação lipídica, tais como citrato sintase e β -HAD. Observamos que o TFA aumentou a atividade da enzima citrato sintase apenas no grupo TF-NO comparado ao grupo SED-NO (Figura 51). Por outro lado, a enzima β -HAD aumentou em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria comparada aos grupos alimentados com dieta normocalórica (Figura 52).

Figura 51: Atividade da citrato sintase no rim. *p $\leq$ 0,05 vs. SED-NO (n=10/grupo).

Figura 52: Atividade da β -HAD no rim. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO e TF-NO (n=10/grupo).

5.10. Componentes do SRA

Considerando o potencial do SRA para modular a via da AMPK e, portanto, regular o balanço entre síntese e oxidação lipídica, avaliamos as vias clássica e não clássicas do SRA em busca do melhor entendimento dos eventos envolvidos na deposição lipídica intra-renal e sua prevenção através do TFA.

Conforme demonstrado na Figura 53A, não houve diferença na atividade da ECA sérica. Por outro lado, houve aumento na atividade da ECA2 sérica em ambos os grupos submetidos ao TFA comparados aos grupos sedentários (Figura 53B).

A

Figura 53: Atividade da ECA no soro (A) (n=10/grupo); Atividade da ECA2 no soro (n=5/grupo) (B). * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO e SED-CAF.

Conforme demonstrado na Figura 54, houve aumento na atividade da ECA renal do grupo SED-CAF comparado aos demais grupos. Além disso, houve aumento no conteúdo de Ang II no rim dos grupos TF-NO, SED-CAF e TF-CAF comparado ao grupo SED-NO (Figura 55). Não houve diferença na expressão proteica do receptor AT2 entre os grupos estudados (Figura 56).

Figura 54: Atividade da ECA no rim. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO, TF-NO e TF-CAF (n=10/grupo).

Figura 55: Conteúdo de angiotensina II no rim. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO (n=5/grupo).

Figura 56: Expressão proteica do receptor AT2 (n=4/grupo).

Não houve diferença na atividade da ECA2 renal (Figura 57) entre os grupos. Da mesma maneira, não foram observadas diferenças no conteúdo de Ang 1-7 no rim (Figura 58) e na expressão proteica do receptor Mas também no rim (Figura 59).

Figura 57: Atividade da ECA2 no rim (n=9/grupo).

Figura 58: Conteúdo de angiotensina 1-7 no rim (n=5/grupo).

Figura 59: Expressão proteica do receptor Mas (n=4/grupo).

6. Discussão

O presente projeto propôs avaliar o papel do TFA para a prevenção de danos renais associados às disfunções metabólicas induzidas por dieta de cafeteria, e se a modulação dos componentes do SRA em conjunto com a ativação da AMPK nos rins participa desta resposta. Primeiramente, confirmamos através do teste de esforço físico máximo que os animais responderam adequadamente ao TFA, pois ambos os grupos treinados apresentaram melhor desempenho em comparação aos grupos sedentários. Essa resposta confirma a eficácia do TFA para a promoção de adaptações aeróbias. Esses resultados corroboram os estudos prévios de Ferreira *et al.* (2007) e Higa *et al.* (2014), nos quais o mesmo protocolo de TFA promoveu adaptações similares na capacidade física. Hoydal *et al.* (2007) demonstraram relação direta entre velocidade de corrida e VO₂ máximo tanto em ratos quanto em camundongos, revelando que quanto maior a capacidade física, melhor a capacidade aeróbia. Essa observação é relevante, pois o aumento da capacidade aeróbia está associado com a redução do risco de doenças cardiovasculares e metabólicas (NETO & FARINATTI, 2003). Por outro lado, baixos níveis de aptidão cardiorrespiratória (VO₂ máximo) têm sido associados com o maior risco de morbimortalidade por doenças crônico-degenerativas, entre elas, doença arterial coronariana, hipertensão arterial sistêmica, DM2 e alguns tipos de câncer (NETO & FARINATTI, 2003).

A dieta de cafeteria tem sido utilizada para o desenvolvimento de modelos experimentais de obesidade e DM2, contribuindo para a investigação de mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão dessas doenças. No nosso estudo, a dieta de cafeteria não induziu maior ganho de peso corporal no grupo SED-CAF comparado ao grupo SED-NO, no entanto, para ambos os grupos treinados TF-NO e TF-CAF, o TFA foi eficaz para reduzir o ganho de peso corporal. É importante observar que, apesar de o grupo SED-CAF não apresentar maior ganho de peso corporal, o peso do depósito do TAB retroperitoneal foi maior comparado aos demais grupos. Embora tenha sido avaliado apenas um depósito de TAB, o aumento do TAB retroperitoneal corrobora nossos dados prévios que demonstraram que a dieta de cafeteria

utilizada no presente estudo induz aumento no peso dos depósitos de TAB, o que tipicamente caracteriza a obesidade (HIGA *et al.*, 2014; HIGA *et al.*, 2014b).

O TFA tem sido constantemente recomendado para o controle de peso corporal, prevenção e tratamento não farmacológico da obesidade, especialmente por promover aumento do gasto energético e, conseqüentemente, interferir diretamente no balanço energético (HUNTER *et al.*, 2010; ARTHAM *et al.*, 2010). O menor peso corporal dos grupos treinados comparado aos grupos sedentários a partir da terceira semana de protocolo até a oitava semana reforçam os achados da literatura sobre o potencial do TFA para o controle de peso corporal, e corroboram nossos dados prévios (HIGA *et al.* 2012; HIGA *et al.*, 2014). A eficácia do TFA para a prevenção do ganho de peso corporal também foi demonstrada em ratos alimentados com dieta de cafeteria durante 12 semanas e submetidos ao TFA com natação 1 hora/dia, 5 vezes/semana, durante 4 semanas (VAISY *et al.*, 2011). Outro estudo realizado com ratos alimentados com dieta hiperlipídica também mostrou os efeitos benéficos do TFA na composição corporal, prevenindo o aumento de peso e a adiposidade corporal (ROCHA-RODRIGUES *et al.*, 2018).

Observamos que o consumo alimentar, tanto em gramas quanto em calorias, não foi diferente entre os grupos estudados. Embora se saiba que o TFA pode induzir aumento da ingestão alimentar, nossos grupos treinados mantiveram o mesmo padrão alimentar, como demonstrado previamente por Higa *et al.* (2014). Esses dados corroboram o estudo de Eguchi *et al.* (2008), que utilizando dietas de cafeteria e controle, não encontraram diferença no consumo alimentar dos grupos treinados com natação. Já Gollisch *et al.* (2009) demonstraram aumento no consumo alimentar de animais treinados, independente da dieta (normocalórica ou hiperlipídica). Esses dados contraditórios podem ser explicados pelas diferenças metodológicas existentes entre os estudos, tais como tipos de dietas, tipo de TFA, duração e intensidade.

Considerando que o controle de peso corporal se dá por meio do equilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, é possível que o menor ganho de peso corporal observado nos grupos TF-NO e TF-CAF seja

decorrente do aumento no gasto energético promovido pelo TFA, uma vez que no presente estudo, esses grupos não apresentaram aumento na ingestão calórica. Esse efeito do TFA para o controle de peso corporal pode ser novamente evidenciado no período em que os animais foram submetidos aos testes em gaiolas metabólicas. Durante as 48 horas de permanência na gaiola, os animais suspendem o TFA, portanto, reduzem o gasto energético, mas não modificam a ingestão calórica. Como consequência, observa-se maior coeficiente metabólico nos animais treinados comparado aos sedentários.

O TFA pode promover a melhora no metabolismo glicêmico, além de ser apontado como uma importante ferramenta para a prevenção da obesidade, reduzindo ou pelo menos mantendo o peso corporal através do aumento do gasto energético, e desta forma atuando também de forma preventiva contra os efeitos deletérios resultantes do aumento do TAB (HIGA *et al.*, 2014; MAZZUCATTO *et al.*, 2014). No nosso estudo, o teste de tolerância à glicose demonstrou que os animais SED-CAF apresentam intolerância à glicose, e que o TFA foi capaz de prevenir esse quadro. Da mesma forma, os animais alimentados com dieta de cafeteria apresentaram RI e, os animais que foram alimentados com a mesma dieta e submetidos ao TFA, não apresentaram RI. Esses dados corroboram o estudo de Higa *et al.* (2014), no qual foi utilizado o mesmo modelo de animal. Um estudo em humanos demonstrou que indivíduos hipertensos e com estágios iniciais de DRC submetidos ao exercício físico combinado (aeróbico e resistido) apresentaram redução da RI (BARCELLOS, *et al.*, 2018). Além disso, Rocha-Rodrigues *et al.* (2018) demonstraram que o TFA melhorou a sensibilidade à insulina de ratos treinados durante 8 semanas independente da dieta que foram alimentados.

Até aqui, o primeiro conjunto de dados permite afirmar que a dieta de cafeteria induziu disfunções metabólicas que confirmam o modelo experimental de obesidade e RI. Além disso, observamos que o TFA foi capaz de prevenir tais prejuízos. O passo seguinte foi avaliar as repercussões para a função renal.

Observamos redução no consumo de água e produção de urina em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria, sem alterações no

balanço hídrico. Na mesma direção, ambos os grupos de cafeteria diminuíram a excreção de potássio e a osmolaridade. A diminuição da excreção renal de potássio pode ocorrer devido à diminuição na quantidade de sódio que chega ao néfron distal, diminuição do nível ou atividade de mineralocorticoide ou alterações na função do ducto coletor cortical (PALMER & CLEGG, 2017). No presente estudo, não avaliamos os eletrólitos no sangue e por isso não obtivemos os resultados de fração de excreção, não sendo possível interpretar esses resultados. Outra possibilidade seria dosar os níveis e/ou atividade da aldosterona. Sabe-se que a aldosterona pode agir no rim regulando a excreção de potássio, e por consequência modificar a regulação de sede (PALMER & CLEGG, 2016). Outra possível explicação para os resultados apresentados seria o menor consumo de potássio (PALMER & CLEGG, 2016), entretanto, não realizamos a dosagem de sódio e potássio na dieta. Além disso, não houve diferença na carga excretada de sódio e cloreto, sugerindo que a manutenção de ambos os solutos pelo néfron está preservada.

A creatinina sérica não foi diferente entre os grupos estudados, bem como não houve diferença na quantidade de creatinina excretada em 24 horas. Baseado nos dados de creatinina, calculamos o RFG. A dieta de cafeteria foi capaz de aumentar em aproximadamente 88% o RFG no grupo SED-CAF comparado com todos os outros grupos. Apesar de os dados de RFG não apresentarem diferença estatística, esses resultados sugerem que o grupo SED-CAF apresenta alteração importante na função renal, a qual em longo prazo pode trazer efeitos deletérios para o desempenho renal. De fato, a medida do RFG é considerada a melhor marcadora de função renal em indivíduos saudáveis ou doentes (ZATZ, 2000). A hiperfiltração glomerular tem sido considerada uma resposta adaptativa inadequada apresentada pelos rins, que pode ser observada no início do curso da doença renal, e pode causar danos irreversíveis para o néfron, levando ao desenvolvimento de estágios mais avançados da DRC (PREMARATNE, *et al.*, 2014). Esta observação é importante, já que a DRC é definida em cinco diferentes estágios, sendo que no primeiro, há aumento de RFG e pouca ou nenhuma presença de proteinúria. Já no segundo, há redução de RFG e de baixa a médio proteinúria, com agravamento cada vez maior da doença até o estágio cinco, quando há perda

severa da função renal refletida pelo brusco declínio do RFG e proteinúria exacerbada (BASTOS *et al.*, 2011; INKER *et al.*, 2014).

Tanto a obesidade quanto o DM2 induzem doença renal através de uma sequência de eventos que se inicia com o aumento do RFG, da pressão intraglomerular, hipertrofia glomerular e microalbuminúria. Com a progressão da doença, o aumento do RFG e o aumento da pressão sistólica, o quadro começa a se agravar e evoluir para a presença de proteinúria, glomeruloesclerose e lesão tubular. Com isso, observa-se o declínio do RFG e a evolução para a doença renal terminal. Além disso, tanto a obesidade quanto o DM2 iniciam sinalizações intracelulares comuns, como a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que agravam o quadro da doença renal (MARIC-BILKAN, 2013).

Não foi encontrada diferença na excreção de proteína entre os grupos estudados. Entretanto, sabe-se que na fase inicial da doença renal, quando há aumento do RFG, o indivíduo pode não apresentar proteinúria (INKER *et al.*, 2014). Também calculamos a razão entre proteína e creatinina urinária, a qual pode ser usada como marcadora de lesão glomerular, entretanto, não foi observada diferença nesse parâmetro entre os grupos estudados, indicando possivelmente ausência de lesão glomerular. Alguns autores têm discutido uma possível resistência de camundongos C57BL/J6 para o desenvolvimento de alterações na função e na morfologia renal (DISSARD *et al.*, 2013; WICKS *et al.* 2015), o que poderia explicar o reduzido prejuízo funcional dos rins no nosso modelo experimental. Apesar disso, o estudo de Dissard *et al.* (2013) demonstrou aumento de 1,5x no RFG em camundongos alimentados com dieta rica em frutose e lipídeos.

Já na dosagem de ureia sérica, observamos redução significativa no SED-CAF e TF-CAF comparados ao SED-NO. Esse resultado parece refletir no resultado do total de ureia excretada em 24 horas que também foi menor em ambos os grupos submetidos à dieta de cafeteria (SED-CAF e TF-CAF). É possível que esse achado esteja associado ao tipo e composição da ração, pois a ração de cafeteria possui 8% menos proteína que a ração padrão, e é

sabido que alterações no consumo de proteína podem induzir alterações nos níveis séricos de ureia (BASTOS, 2011).

O modelo experimental de obesidade e RI induzido por dieta de cafeteria foi escolhido para o presente trabalho por provocar alterações metabólicas importantes em tecidos metabolicamente ativos como o TAB e o músculo esquelético. Em estudo prévio, demonstramos que a dieta de cafeteria induziu prejuízos no balanço lipólise e lipogênese do TAB, aumento de ácidos graxos livres, aumento da adiposidade, hiperleptinemia e diminuição dos níveis séricos de adiponectina (HIGA *et al.*, 2014). Em função de tais respostas, escolhemos o mesmo modelo para investigar a estrutura e função renal diante do consumo de dieta de cafeteria.

Para nossa surpresa, diferente do TAB, o tecido renal tem se mostrado mais tolerante às perturbações provenientes da dieta de cafeteria. Isso pode ser decorrente não apenas da composição da dieta, mas também em função do tempo de administração da mesma. Possivelmente se fosse usada uma dieta com maior conteúdo lipídico ou se aumentássemos para 10 ou 12 semanas de tratamento, a repercussão renal talvez fosse mais evidente. De fato, a literatura mostra que dietas hiperlipídicas podem causar alterações importantes na função e morfologia renal (HENEGAR *et al.*, 2001; DISSARD *et al.*, 2013). Apesar de não apresentar estágios mais avançados de DRC, o modelo presente parece interessante para estudar os efeitos protetores do TFA, uma vez que estágios avançados de DRC podem ser difíceis de tratar e até mesmo irreversível, sendo necessária terapia renal substitutiva (BASTOS *et al.*, 2010).

Sob o aspecto morfológico, observamos redução no espaço de Bowman no grupo SED-CAF comparado ao grupo SED-NO. Muitos estudos foram desenvolvidos ao longo dos anos tentando entender as alterações morfológicas renais associadas a outras patologias, como hipertensão, dislipidemia e obesidade. Várias alterações morfológicas renais podem ocorrer durante o desenvolvimento do estágio final da DRC, incluindo alterações microvasculares com hialinose das paredes dos vasos pré-glomerulares e espessamento da íntima e reduplicação da lâmina elástica interna das artérias arqueadas e

interlobares. Essas alterações podem levar a danos glomerulares, glomeruloesclerose, atrofia tubular irregular e fibrose. Normalmente, os glomérulos hialinizados são menores que o normal devido à perda de elementos celulares (MARIN, 2005; ONO, 1997). Essas alterações são classicamente encontradas em modelos de hipertensão arterial sistêmica. Entretanto, Vellez *et al.* (2017) mostraram alterações similares mesmo sem aumento da pressão arterial, e que tais alterações estavam associadas a alterações no SRA, principalmente com o aumento do Ang II intra-renal. Neste trabalho os autores discutem a importância da angiotensinase aminopeptidase A, uma aminopeptidase que metaboliza a Ang II. A diminuição dessa molécula levaria ao maior acúmulo de Ang II intra-renal aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento de lesão renal.

Quando avaliamos a deposição lipídica renal, observamos aumento considerável no grupo SED-CAF comparado ao grupo SED-NO e ao TF-NO, e uma prevenção desse aumento no grupo TF-CAF. Durante a observação das lâminas coradas com oil red, pôde-se perceber que as gotículas de lipídeos se acumularam principalmente em túbulos. Em geral, os glomérulos têm pouca ou nenhuma deposição lipídica. De fato, Bobulescu *et al.* (2014) demonstraram em humanos que há maior deposição lipídica em células de túbulos proximais e que há correlação positiva entre IMC e a quantidade de lipídeos no rim. Este processo de lipotoxicidade no rim está associado com alterações no metabolismo lipídico, RI, geração de espécies reativas de oxigênio, estresse de retículo e apoptose (IZQUIERDO-LAHUERTA *et al.*, 2016).

A deposição lipídica é um importante gatilho para o desenvolvimento de fibrose e inflamação. Embora não tenha sido observada diferença estatística na deposição de colágeno, observamos aumento de aproximadamente 50% no colágeno total, sem qualquer alteração na avaliação de colágeno por glomérulo, o que sugere tendência a maior deposição de colágeno em túbulos. Não observamos alterações no conteúdo de fibronectina, colágeno IV e TGF- β . Entretanto, houve aumento na expressão proteica do TNF- α em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria, e tendência ao aumento na expressão da IL-6 ($p=0,07$) nos mesmos grupos. Em conjunto, os resultados de

marcadores inflamatórios sugerem que os animais dos grupos submetidos à dieta de cafeteria apresentam processo inflamatório ainda inicial, e que o TFA não foi capaz de prevenir essa resposta, pelo menos em relação aos marcadores pró-inflamatórios. É importante considerar que o efeito benéfico do TFA para a resposta inflamatória pode não ser decorrente apenas da redução na produção de citocinas inflamatórias, mas também pelo aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, como por exemplo, a IL-10 (SPERETTA *et al.*, 2014).

Em síntese, os dados morfofuncionais renais obtidos no presente estudo permitem afirmar que a dieta de cafeteria provocou no grupo SED-CAF alteração limítrofe na função renal, representada pelo aumento do RFG, porém sem o desenvolvimento de proteinúria. Além disso, alterações morfológicas foram evidenciadas pela redução da cápsula de Bowman e espaço de Bowman e, principalmente, pelo aumento exacerbado da deposição lipídica intra-renal. O aumento da deposição lipídica intra-renal não induziu fibrose, no entanto, parece ter dado início a um processo inflamatório, ainda que sutil, observado pelo aumento na expressão proteica do TNF- α . Já o TFA preveniu o aumento do RFG e o acúmulo de lipídeos nos rins do grupo TF-CAF. Entretanto, o TFA não foi capaz de prevenir o aumento da expressão do TNF- α . Diante desses resultados, passamos a estudar os mecanismos renais que pudessem estar envolvidos no aumento da deposição lipídica intra-renal e os efeitos do TFA.

A AMPK é uma molécula que funciona como sensor de energia na célula. Quando está fosforilada, ou seja, em sua forma ativa, é responsável por ativar vias que aumentam a síntese de ATP disponibilizando mais glicose e ácido graxo para a oxidação, e também por inativar as vias que consomem ATP (LIM *et al.*, 2010). A SIRT-1 exerce ações semelhantes à AMPK ao ativar proteínas envolvidas no metabolismo energético como o PGC1- α , e também é capaz de inibir o fator de transcrição SREBP-1, que é um dos responsáveis pela síntese de ácidos graxos (MADSON, 2016). No presente estudo, observamos aumento da AMPK fosforilada, porém não observamos diferenças na expressão proteica da SIRT-1 e do PGC1 α , bem como na expressão gênica do SREBP-1. O resultado da AMPK corrobora nosso estudo prévio, no qual

demonstramos aumento da AMPK no TAB induzido pelo TFA em camundongos alimentados com dieta de cafeteria (Higa *et al.*, 2014). Kim *et al.* (2013) demonstraram que a ativação da AMPK e da SIRT-1 induzida através da administração de resveratrol reduziu a lipotoxicidade, a apoptose e o estresse oxidativo presentes na ND através da ativação de PGC-1 α , o que confirma o papel de tais proteínas no controle da deposição lipídica renal. Embora alguns trabalhos na literatura tenham demonstrado a importância da ativação de proteínas como AMPK, SIRT-1 e PGC1 α para a prevenção de distúrbios metabólicos e doenças renais associadas ao excesso de lipídeos (SOETIKNO *et al.*, 2013; SRIWIJITKAMOL *et al.*, 2007; LITTLE *et al.*, 2010), não se sabia se o TFA seria capaz de induzir as mesmas respostas em tecido renal. Nesse contexto, a ativação da AMPK com subsequente aumento de proteínas envolvidas na melhora do metabolismo lipídico por meio do TFA parece ocorrer de forma mais ampla nos locais em que os processos de armazenamento e oxidação de lipídeos estão mais ativos, como no TAB e no músculo esquelético. Assim, é possível que a cooperação entre o TAB e o músculo esquelético promovida pelo TFA que favorece a melhora na habilidade do organismo em lidar com o excesso de lipídeos seja fundamental para reduzir a disponibilidade de ácidos graxos para os rins, e portanto, prevenir o acúmulo induzido pela dieta de cafeteria.

Embora a expressão proteica do PGC1- α não tenha sido modificada, a associação entre a ativação da AMPK no rim pelo TFA e a prevenção da deposição lipídica pode ser mediada por outros mecanismos. Segundo Hardie (2017), foram descritas pelo menos 60 proteínas alvo para AMPK. Os primeiros alvos a serem descobertos foram, em geral, enzimas metabólicas. No presente estudo escolhemos estudar como alvo de ação da AMPK, o PGC1- α . Entretanto não parece ser por essa via que a AMPK está exercendo seu papel no metabolismo lipídico intra-renal em nosso modelo. Neste contexto, outras moléculas podem futuramente ser exploradas para explicar como a AMPK poderia estar envolvida na prevenção da deposição lipídica intra-renal. Por exemplo, a AMPK pode ativar o catabolismo celular resultando em melhora do desempenho mitocondrial e aumento da oxidação lipídica. Isso pode ser mediado pelo aumento na expressão da CD36 (cluster de diferenciação 36) e

por consequência, aumento na absorção de ácido graxo; aumento na expressão de proteínas relacionadas com fissão mitocondrial (MFF- fator de fissão mitocondrial), além de autofagia (ULK ½-Unc-51 quinase ativadora de autofagia). No outro lado da balança, a AMPK pode inibir o anabolismo, por exemplo, através da inibição da proteína HMGR (HMG-CoA redutase) que é responsável pela síntese de colesterol, ou da GPAT (glicerol fosfato acetil transferase), que é responsável pela síntese de triacilglicerol fosfolípido (HARDIE, 2017).

Ainda com o objetivo de avaliar a capacidade de oxidação de lipídeos nos rins, estudamos as enzimas β -HAD e citrato sintase, as quais participam efetivamente da beta-oxidação e do Ciclo de Krebs, respectivamente. Observamos que o TFA aumentou a atividade de ambas as enzimas apenas no grupo TF-NO. Possivelmente, os efeitos causados pela dieta de cafeteria sobrepõem o efeito do TFA, impedindo o aumento da atividade da enzima citrato sintase no grupo TF-CAF. De forma surpreendente, a atividade da β -HAD aumentou em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria, sugerindo possível regulação alostérica dessa enzima em decorrência da maior quantidade de substrato disponível para metabolização.

Considerando que o TFA induziu aumento na expressão da forma ativa da AMPK no grupo TF-CAF, e que nessa condição a AMPK aciona mecanismos que aumentam a metabolização de substratos energéticos, é possível afirmar que a proteína AMPK participa das respostas renais ao TFA, especialmente na redução da deposição lipídica renal, entretanto, essa ação é independente da ativação do PGC-1 α e da ACC, e também da inativação do SREBP-1.

As perguntas seguintes que foram respondidas no presente estudo abordaram o SRA. Não observamos alteração na atividade da ECA sérica, por outro lado, a atividade da ECA 2 sérica aumentou em ambos os grupos treinados. Apesar de não termos avaliado os outros componentes do SRA no soro, o aumento na atividade da ECA 2 induzido pelo TFA pode levar ao aumento na concentração de Ang 1-7 sérica. Esse efeito seria positivo para os animais treinados, uma vez que as ações da Ang 1-7 contrapõem os efeitos

prejudiciais da Ang II. A melhora na concentração de ECA 2 também havia sido demonstrada por Gomes-Santos *et al.*, (2014). Nesse estudo, os autores observaram que o TFA proporcionou a normalização da ECA 2 sérica em animais com insuficiência cardíaca submetidos ao TFA.

A modulação dos componentes do SRA no rim pela dieta e pelo TFA foi demonstrada pela primeira vez neste estudo. Observamos aumento na atividade da ECA renal no grupo SED-CAF comparado aos demais grupos, e o TFA preveniu esse aumento no grupo TF-CAF. Entretanto, o principal peptídeo ativo da alça clássica do SRA, a Ang II, aumentou nos três grupos experimentais comparados ao grupo SED-NO. Esses dados revelaram que o TFA promoveu aumento da Ang II no rim independente da ação da ECA nos grupos TF-NO e TF-CAF. Um possível mecanismo que poderia estar acionado para induzir esse efeito nos grupos treinados seria o aumento da enzima quimase, a qual exerce ação equivalente a da ECA na conversão de Ang I em Ang II (RESENDE & MILL, 2002). Outra explicação seria o aumento na quantidade angiotensinogênio, que poderia por sua vez, elevar a quantidade de substrato para a ação da enzima ECA.

O aumento na concentração de Ang II renal pode repercutir negativamente para as características morfofuncionais renais. De fato, o aumento do RFG e da expressão proteica do TNF- α no grupo SED-CAF pode ter associação direta com a maior concentração de Ang II, pois é sabido que a Ang II pode induzir hiperfiltração glomerular e inflamação (HALL *et al.*, 2015). O aumento da Ang II renal em nosso modelo corrobora o estudo de Chung *et al.* (2009), no qual ratos espontaneamente hipertensos alimentados com dieta hiperlipídica, apresentaram aumento no conteúdo de Ang II renal associado ao aumento na deposição lipídica e inflamação. Curioso observar que, mesmo com a Ang II aumentada, os animais submetidos ao TFA não apresentaram as respostas morfofuncionais observadas no grupo SED-CAF, exceto o aumento do TNF- α , o que possibilita especular que outros mecanismos compensatórios sejam acionados pelo TFA, mas que não foram investigados no presente estudo.

O aumento da concentração de Ang II nos grupos SED-CAF e TF-CAF pode ter associação direta com o aumento da expressão gênica do SREBP-2 em ambos os grupos. De fato, segundo Yang *et al.* (2017), o aumento da Ang II no rim provoca aumento na expressão gênica do SREBP-2, acúmulo de colesterol, lesão de podócitos e progressão da DRC. Apesar de o aumento da Ang II e do SREBP-2 ocorrer em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria, é possível que a repercussão renal seja menor para o grupo TF-CAF após um longo período de manutenção dessa condição, ou até mesmo em função do aumento na ativação da AMPK. Embora se saiba que a Ang II reduz a fosforilação da AMPK (YANG, *et al.*, 2016), esta associação foi descartada no nosso estudo, uma vez que nenhum grupo apresentou diminuição na fosforilação da AMPK.

Nos últimos anos, a alça não clássica do SRA ECA2/Ang 1-7/Mas surgiu como importante mecanismo envolvido na prevenção de patologias associadas à obesidade e ao DM2. Embora outros estudos tenham reportado que o TFA induziu hiperativação desse eixo, não observamos efeitos da dieta de cafeteria bem como do TFA sobre os componentes do SRA ECA2/Ang 1-7/Mas no rim. Esses resultados vão à direção oposta do que esperávamos encontrar no presente estudo, no entanto, uma possível explicação para ser considerada é a observação feita por Frantz *et al.* (2017), os quais descreveram que apenas o elevado volume de treinamento físico seria capaz de alterar positivamente a alça ECA2/MAS no músculo esquelético de ratos obesos. Neste contexto, o nosso protocolo de treinamento físico de baixo volume e/ou intensidade poderia ser um fator limitante para a modulação da alça não clássico do SRA.

Baseado nos resultados de SRA obtidos no presente estudo pode-se sugerir que o TFA, assim como a dieta de cafeteria, induz aumento da Ang II renal, entretanto, é possível que outros mecanismos compensatórios sejam acionados pelo TFA para proteger o rim dos danos morfofuncionais induzidos pela dieta de cafeteria. Além disso, não observamos efeitos do TFA sobre a alça ECA2/Ang 1-7/Mas no rim. Com isso, o efeito protetor do TFA contra o desenvolvimento de danos renais induzidos por dieta de cafeteria está

associado com a ativação da AMPK, porém independe da redução da alça ECA/Ang II/AT1 e/ou o aumento da alça ECA2/Ang 1-7/Mas no rim.

7. Conclusão

Em conclusão, o TFA preveniu os danos renais causados pela dieta de cafeteria, tais como acúmulo de lipídeos nos rins, aumento do RFG e redução do espaço de Bowman, e essa resposta está associada, pelo menos em parte, com a maior ativação da AMPK independente da contribuição do SRA.

8. Referências Bibliográficas

AGARWAL, D., *et al.* Chronic exercise preserves renal structure and hemodynamics in spontaneously hypertensive rats. **Antioxid Redox Signal**, v.16, n.2, p.139-52. Jan. 15, 2012.

ALP P.R. *et al.* Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem J.**, v.154, n.3, p.689-700, 1976.

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.

ARTHAM S. M., *et al.* Value of weight reduction in patients with cardiovascular disease. **Curr Treat Options Cardiovasc Med**, v.12, n.1, p.21-35, 2010.

BAILEY, J. L. Insulin Resistance and Muscle Metabolism in Chronic Kidney Disease. **ISRN Endocrinology**, 2013.

BARCELLOS, F. C., *et al.* Exercise in patients with hypertension and chronic kidney disease: a randomized controlled trial. **J Hum Hypertens.**, p.1-11, 2018.

BARDOUX, P., *et al.* Vasopressin contributes to hyperfiltration, albuminuria, and renal hypertrophy in diabetes mellitus: study in vasopressin-deficient Brattleboro rats. **Proc Natl Acad Sci.**, v.96, n.18, p.10397-402. Aug. 31, 1999.

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

BASTOS, M. G. Biomarcadores na nefrologia. São Paulo, 1ª edição: Roche, 2011.

BASTOS, M. G. *et al.* Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Rev Assoc Med Bras.**, v.56, n.2, p 248-53, 2010.

BASTOS, M. G., *et al.* Doença Renal Crônica: Problemas e Soluções. **J Bras Nefrol.**, v.26, n.4, p.202-215. Dez., 2004.

BOBULESCU, I. A., *et al.* Triglycerides in the human kidney cortex: Relationship with body size. **PlosOne**, v.9, n.8, p 1-8. Aug., 2014.

BONORA, E., *et al.* Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.68, n.2, p.374-8. Feb., 1989.

BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. **Nephrol Dial Transplant**, v.24, n.11, p.3265-8. Nov., 2009.

BUENO JUNIOR, C. R., *et al.* Combined effect of AMPK/PPAR agonists and exercise training in mdx mice functional performance. **PLoS One**, v.7, n.9, p.e45699, 2012.

CHEN, J., *et al.* The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. **Ann Intern Med.**, v.140, n.3, p.167-74. Feb. 3, 2004.

CHUNG, S., *et al.* Tempol or candesartan prevents high-fat diet-induced hypertension and renal damage in spontaneously hypertensive rats. **Nephrol Dial Transplant.**, v.25, n.2, p.389-399. Feb., 2010.

CULVER, S. *et al.* Intrarenal Angiotensin-Converting Enzyme: the Old and the New. **Curr Hypertens Rep.**, v.19, n.10, 1-7. Sep., 2017.

CUMMINGS, B. P., *et al.* Subcutaneous administration of leptin normalizes fasting plasma glucose in obese type 2 diabetic UCD-T2DM rats. **Proc Natl Acad Sci.**, v.108, n.35, p.14670-5. Aug. 30, 2011.

DAY, E. A. AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. **Trends Endocrinol Metab.**, v.28, n.8, p.545-560. Aug., 2017.

DE PAULA, R. B. Obesidade, Síndrome Metabólica e Progressão da Lesão Renal. **Bras Nefrol.**, v.28, p.12-17. Set., 2006.

DELARUE, J. & MAGNAN, C. Free fatty acids and insulin resistance. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.10, n.2, p.142-8, 2007.

DINCER, S. *et al.* Effects of a regular exercise program on biochemical parameters of type 2 diabetes mellitus patients. **J Sports Med Phys Fitness**, v.56, n.11, p-1384-1391. Nov., 2016.

DISSARD, R. *et al.* Long Term Metabolic Syndrome Induced by a High Fat High Fructose Diet Leads to Minimal Renal Injury in C57BL/6 Mice. **Plos One**, v.8, n.10, p.1-13. Oct., 2013.

EGUCHI R., *et al.* Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity. **Rev Bras Med Esporte**, v.14, n.3, p.182-187, 2008.

EKINCI, E. I., *et al.* Renal Structure in Normoalbuminuric and Albuminuric Patients With Type 2 Diabetes and Impaired Renal Function. **Diabetes Care**, Jul. 8, 2013.

FANTUZZI, G. Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases. **Cytokine**, Jul. 11, 2013.

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.

FERNANDES, T. *et al.* Characterization of angiotensin-converting enzymes 1 and 2 in the soleus and plantaris muscles of rats. **Braz J Med Biol Res.**, v.43, p.837–842, 2010.

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. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v.34, n.8, p.760-5. Aug., 2007.

FERREIRA, L. T., *et al.* Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**. v.28, p.182-188, 2011.

FIORINO, P. *et al.* Exposure to high-fat diet since post-weaning induces cardiometabolic damage in adult rats. **Life Science**. v.160, p12-17, Sept., 2016.

FLATT, J. P. Use and storage of carbohydrate and fat. **Am J Clin Nutr**, v.61, n.4 Suppl, p.952S-959S. Apr., 1995.

FONSECA-ALANIZ, M. H., *et al.* Tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. bras. de endocrinol metab.**, v.50, p.216-19, 2006.

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

FRANTZ, E.D.C., *et al.* High, but not low, exercise volume shifts the balance of renin-angiotensin system toward ACE2/Mas receptor axis in skeletal muscle in obese rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.313, n.4, pE473-482. Jul., 2017.

GIANI, J. F. *et al.* Angiotensin-(1–7) improves cardiac remodeling and inhibits growthpromoting pathways in the heart of fructose-fed rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 298, 2010.

GIOVANNA, L., *et al.* RAAS inhibition and renal protection. **Curr Pharm Des.**, v.18, n.7, p.971-80, 2012.

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 Journ of Physiol and Endocrinol Metab.**, v. 297, p. 495-504, 2009.

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.

GROSS, J. L. Microalbuminuria e a Síndrome Metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.47, p.109-110, 2003.

GRUNDY, S. M. Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome. **J Investig Med.**, v.64, n.6, p.1082-1086. Aug., 2016.

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

GUYTON, A. C. & J. E. HALL. Tratado de Fisiologia Médica. Rio De Janeiro: 11ª edição, Editora Elsevier 2006.

HALL, J. *et al.* Obesity-Induced Hypertension Interaction of Neurohumoral and Renal Mechanisms. **Circulation Research**, v.116, p.991-1006, 2015.

HARDIE, D.G. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. **J. R. Soc. Interface**, v.15, p.1-23, 2018.

HENEGAR, J. R., *et al.* Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. **J Am Soc Nephrol.**, v.12, n.6, p.1211-7. Jun., 2001.

HIGA T.S., *et al.* Physical training prevents body weight gain but does not modify adipose tissue gene expression. **J Med Biol Res.**, v.45, n.10, p.988-994, 2012.

HIGA, T.S. *et al.* Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.** v.6, n.1, p.47-54, 2014.

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.

HILL, J. O., *et al.* Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v.16, n.5, p.321-33. May, 1992.

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

HUNTER, G. R., *et al.* Exercise training prevents regain of visceral fat for 1 year following weight loss. **Obesity (Silver Spring)**, v.18, n.4, p.690-5. Apr., 2010.

INAGAMI, T. *et al.* Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview. **J Hypertens Suppl**, v.12, n.10, p.S83-94. Dec., 1994.

INKER, L. A. KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of CKD. **Am J Kidney Dis.**, v.63, n.5, p.713-735, 2014.

ISHIGAKI, N., *et al.* Involvement of glomerular SREBP-1c in diabetic nephropathy. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.364, n.3, p.502-8. Dec. 21, 2007.

IX, J. H. & K. SHARMA. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. **J Am Soc Nephrol.**, v.21, n.3, p.406-12. Mar., 2010.

IZQUIERDO-LAHUERTA, A. *et al.* Lipotoxicity as a trigger factor of renal disease. **J. Nephrol.**, 2016.

JOCKEN J. W. & BLAAK E. E. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. **Physiol Behav.**, v.94, n.2, p.219-30, 2008.

JOHANSEN, K. L. Exercise and chronic kidney disease: current recommendations. **Sports Med.**, v.35, n.6, p.485-99, 2005.

KALUPAHANA, N. S. & N. MOUSTAID-MOUSSA. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. **Obes Rev.**, v.13, n.2, p.136-49. Feb., 2012.

KEANE, W. F. The role of lipids in renal disease: future challenges. **Kidney Int. Suppl.**, v.75, p.S27-31. Apr., 2000.

KIM, H. J., *et al.* Effect of exercise training on muscle glucose transporter 4 protein and intramuscular lipid content in elderly men with impaired glucose tolerance. **Eur J Appl Physiol.**, v.93, n.3, p.353-8. Dec., 2004.

KIM, M. Y., *et al.* Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK-SIRT1-PGC1alpha axis in db/dbmice. **Diabetologia**, v.56, n.1, p.204-17. Jan., 2013.

KUME, S. *et al.* Role of Altered Renal Lipid Metabolism in the Development of Renal Injury Induced by a High-Fat Diet. **J Am Soc Nephrol.**, v.18, p.2715–2723, 2007

LAGRANHA, C. J., *et al.* Bases Moleculares da Glomerulopatia Diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.51, p.901-912, 2007.

LEEHEY D. J., *et al.* Structured Exercise in Obese Diabetic Patients with Chronic Kidney Disease: A Randomized Controlled Trial. **Am J Nephrol.**, v.44, n.4, p.52-64. Jul., 2016.

LEHNIG A. C and STANFORD K. I. Exercise-induced adaptations to white and brown adipose tissue. **J Exp Biol.**, v.221, p.2-8, 2018.

LITTLE, J. P., *et al.* A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. **J Physiol.**, v.588, n.6, p.1011-22. Mar. 15, 2010.

LOCATELLI, F., *et al.* Renal manifestations in the metabolic syndrome. **J Am Soc Nephrol.**, v.17, n.4 Suppl 2, p.S81-5. Apr., 2006.

MADISON, B. B. Srebp2: A master regulator of sterol and fatty acid synthesis. **Journal of Lipid Research.**, v.57, p.333-335, 2016.

MARIC-BILKAN, C. Obesity and Diabetic Kidney Disease. **Med Clin North Am.**, v.97, n.1, p.59–74, 2014.

MARIN, R. *et al.* Systemic and glomerular hypertension and progression of chronic renal disease: The dilemma of nephrosclerosis. **Kidney International**, v.68, n.99, p.s52-s56, 2005.

MAUER, M. *et al.* Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. **N Engl J Med.**, v.361, n.1, p.40-51, 2009.

MAZZUCATTO, F., *et al.* Reversal of metabolic adaptations induced by physical training after two weeks of physical detraining. **J Clin Exp Med.**, v.15, p.2000-8, 2014.

MUÑOZ, M. C. *et al.* Angiotensin-(1–7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas. **Regul Pept.**, v.61, p.1–7, 2010.

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

NETO M, de Albuquerque G, FARINATTI PdTV. Equações de predição da aptidão cardiorrespiratória sem testes de exercício e sua aplicabilidade em estudos epidemiológicos: revisão descritiva e análise dos estudos. **Rev bras med esporte**, v.9, n.5, p.304-14, 2003.

NIELSEN, J. *et al.* Increased subsarcolemmal lipids in type 2 diabetes: effect of training on localization of lipids, mitochondria, and glycogen in sedentary human

skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v.298, n.3, p.E706-13, 2010.

OIGMAN, W. & M. NEVES, F. T.. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. **Rev Bras Hipertens.**, v.7, p.261-267, 2000.

ONO, H. & ONO, Y. Nephrosclerosis and hypertension. **Medical clinics of north America**, v.81, n.6, p-1273-1288. Nov.,1997.

Organização Mundial Da saúde (OMS), Obesitya and Overweight. Nations, Estados Unidos da América,: Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: Mar. 2018.

PALMER, B. F. & CLEGG D. J. Diagnosis and treatment of hyperkalemia. **Cleve Clin J Med.**, v.84, n.12, p.934-942. Dec., 2017.

PALMER, B. F. & CLEGG D. J. Physiology and pathophysiology of potassium homeostasis. **Adv Physiol Educ.**, v.40, n.4, p-480-490. Dec., 2016.

PHAN, H. *et al.* Chronic Kidney Disease, Insulin Resistance, and Incident Diabetes in Older **Adults. Clin J Am Soc Nephrol.**, v.7, p588–594. Apr., 2012.

PREMARATNE, E., *et al.* The impact of hyperfiltration on the diabetic kidney. **Diabetes Metab.**, v.14, p1-13. Nov. 18, 2014.

RAMKUMAR, N., *et al.* Association of obesity with inflammation in chronic kidney disease: a cross-sectional study. **J Ren Nutr.**, v.14, n.4, p.201-7. Oct., 2004.

RESENDE, M. M. & MILL, J.G. Vias Alternativas de Produção de Angiotensina II e sua Importância em Condições Fisiológicas ou Fisiopatológicas. **Arq Bras Cardiol.**, v.78, n.4, p.425-4315, 2002.

RIBEIRO-OLIVEIRA, A. JR. *et al.* The effects of chronic candesartan treatment on cardiac and hepatic adenosine monophosphate-activated protein kinase in rats submitted to surgical stress. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, p.1-7, 2013.

RICHTER, E. A. & HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. **Physiol Rev.**, v.93, n.3, p.993-1017. Jul., 2013.

- ROCHA-RODRIGUES, S., *et al.* Physical exercise mitigates high-fat diet-induced adiposopathy and related endocrine alterations in an animal model of obesity. **Journ. of Physiol. and Biochem.**, p.1-12, 2018.
- RUSTER, C. & WOLF. G. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in obesity-related renal diseases. **Semin Nephrol.**, v.33, n.1, p.44-53. Jan., 2013.
- SALGADO, P. P. C. A., *et al.* Physiopathology Of Diabetic Nephropathy. **Rev Med Minas Gerais**, v.14, p.180-185, 2004.
- SALMINEN, A., *et al.* AMP-activated protein kinase inhibits NF-kappaB signaling and inflammation: impact on health span and lifespan. **J Mol Med (Berl)**, v.89, n.7, p.667-76. Jul., 2011.
- SANJULIANI, A. F., *et al.* Eixo renina-angiotensina-aldosterona: bases fisiológicas e fisiopatológicas. **Revista Do Hospital Universitario Pedro Ernesto**, v.10, p.20-30. Set., 2011.
- SANTOS, R. A., *et al.* Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. **Hypertension**, v.27, n.4, p.875-84. Apr., 1996.
- SANTOS, S. H. S. *et al.* Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a highfat diet. **Regul Pept.**, v. 178, p. 64–70, 2012.
- SHARMA, K., *et al.* Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. **J Clin Invest.**, v.118, n.5, p.1645-56. May, 2008.
- SILVA, K. A., *et al.* Previous exercise training has a beneficial effect on renal and cardiovascular function in a model of diabetes. **PLoS One**, v.7, n.11, p.e48826, 2012.
- 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.
- SOETIKNO, V., *et al.* Curcumin decreases renal triglyceride accumulation through AMPK SREBP signaling pathway in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. **J Nutr Biochem.**, v.24, n.5, p.796-802. May, 2013.

SPERETTA, G. F. F. *et al.* Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Rev. Hosp. Pedro Ernesto.**, v.13, n.1, p.61-69. Mar., 2014.

SRIWIJITKAMOL A, *et al.* Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. **Diabetes**, v.56, n.3, p.836-848, 2007.

SU W. *et al.* Crosstalk of Hyperglycemia and Dyslipidemia in Diabetic Kidney Disease. **Kidney Dis (Basel)**, v.3. n.4, p.171-180. Sep., 2017.

SU, Z. *et al.* Angiotensin-(1–7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. **Kidney Int.**, v.69, p.2212–18, 2006.

SUN, L., *et al.* Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. **J Biol Chem.**, v.277, n.21, p.18919- 27. May 24, 2002.

TABONY, A.M. *et al.* Angiotensin II upregulates PP2C α and inhibits AMPK signaling and energy balance leading to skeletal muscle wasting. **Hypertension**, v.58, n.4, p.643–649, 2011.

TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the Mas receptor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.289: p1560–1566, 2005.

TETA, D. Insulin resistance as a therapeutic target for chronic kidney disease. **J Ren Nutr.** v.25, n.2, p.226-9, 2015.

TOWLER, M. C. & D. G. HARDIE. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. **Circ Res.**, v.100, n.3, p.328-41. Feb 16, 2007.

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. **JAMA**, v.305, n.17, p.1790-9. May 4, 2011.

VAISY M., *et al.* Exercise-induced, but not creatine-induced, decrease in intramyocellular lipid content improves insulin sensitivity in rats. **J Nutr Biochem.**, v.22, p.1178-1185, 2011.

VELEZ, J. Q. C. *et al.* Deficiency of the Angiotensinase Aminopeptidase A Increases Susceptibility to Glomerular Injury. **J Am Soc Nephrol.**, v.7, p.2119-2132. Jul., 2017.

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.

WAHBA, I. M. & MAK, R. H. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v.2, n.3, p.550-62. May, 2007.

WANG, Z., *et al.* Regulation of renal lipid metabolism, lipid accumulation, and glomerulosclerosis in FVB db/db mice with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.54, n.8, p.2328-35. Aug., 2005.

WANG, Z., *et al.* Synergistic action of inflammation and lipid dysmetabolism on kidney damage in rats. **Renal Failure**, v.40, n.1, p.175-82. Mar., 2018.

WICKS, S. E. *et al.* Diet-induced obesity and kidney disease – in search of a susceptible mouse model. **Biochimie.**, v.124, p.65-73, 2016.

WINNICK, J. J., *et al.* Short-term aerobic exercise training in obese humans with type 2 diabetes mellitus improves whole-body insulin sensitivity through gains in peripheral, not hepatic insulin sensitivity. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.93, n.3, p.771-8. Mar., 2008.

WOLF, G & ZIYADEH, Z. N. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. **Nephronophysiol.**, v.106, p26-31, 2007.

XITA, N. & A. TSATSOUKIS. Adiponectin in diabetes mellitus. **Curr Med Chem**, v.19, n.32, p.5451-8, 2012.

YANG, K. K., *et al.* Cross-talk between AMP-activated protein kinase and renin-angiotensin system in uninephrectomised rats. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v.17, n.4, p.1-9. Oct., 2016.

YANG, Y. *et al.* Angiotensin II induces cholesterol accumulation and injury in podocytes. **Sci Rep.**, v.7, n.1, p.1-10. Sep., 2017.

ZATZ, R. Fisiopatologia renal Editora Atheneu 2000.

ZHAO, X., *et al.* Glomerular expression of kidney injury molecule-1 and podocytopenia in diabetic glomerulopathy. **Am J Nephrol.**, v.34, n.3, p.268-80, 2011.

ZHENG, Y. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Ang-(1-7) in Ameliorating HFD-Induced Renal Injury through LDLr-SREBP2-SCAP Pathway. **Plos one**, v. 10, n.8, p.1-18, 2015.

ZIMMERMAN & BURNS. Angiotensin (1-7) in kidney disease: a review of the controversies. **Clin Sci.**, v.136, n. 6, p.333-346, 2012.