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

MARILIA MARCONDES FERREIRA

**Treinamento físico aeróbio e prevenção da doença hepática gordurosa não
alcoólica: papel da lipogênese e do
estresse de retículo no fígado**

SÃO PAULO

2019

MARILIA MARCONDES FERREIRA

**Treinamento físico aeróbio e prevenção da doença hepática gordurosa não
alcoólica: papel da lipogênese e do
estresse de retículo no fígado**

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

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em 9 de dezembro de 2019. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de concentração: Atividade Física e Saúde

Orientadora:

Profa. Dra. Fabiana de Sant'Anna Evangelista

SÃO PAULO

2019

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

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

Ferreira, Marília Marcondes

Treinamento físico aeróbio e prevenção de doença hepática gordurosa não alcoólica: papel da lipogênese e do estresse de retículo no fígado / Marília Marcondes Ferreira ; orientadora Fabiana de Sant'Anna Evangelista. – 2019

66 p. : il.

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

1. Treinamento físico. 2. Treinamento aeróbio. 3. Hepatopatias - Prevenção. 4. Fígado gorduroso - Prevenção.
I. Evangelista, Fabiana de Sant'Anna, orient. II. Título

CDD 22.ed. – 613.7

Nome: FERREIRA, Marilia Marcondes

Treinamento físico aeróbio e prevenção da doença hepática gordurosa não alcoólica:
papel da lipogênese e do estresse de retículo no fígado

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

Área de concentração: Atividade Física e Saúde

Aprovado em: 09 /12 /2019

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr.(a)	Miriam Helena F. Alaniz	Instituição:	Incor/HCFMUSP
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Prof.(a) Dr.(a)	Tiago Fernandes	Instituição:	EEFE/USP
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

Prof.(a) Dr.(a)	Anna Karenina A. Martins	Instituição:	EACH/USP
Julgamento:	_____	Assinatura	_____

Dedicatória

À minha saúde, por me permitir galgar essa caminhada com força e dedicação,
e aos meus pais, que juntos, formaram o alicerce deste trabalho.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração, no qual desenvolvi esse estudo

À Dra. Míriam Helena Fonseca-Alaniz, pela disposição em me ajudar sempre que precisei

Aos meus amigos, Bruno, Luiz, Cynthia, Anna Laura, Daniela e Renata por todo companheirismo, apoio e trabalho em equipe

À minha família, por todo amor e cuidado

À Profa Dra. Fabiana de Sant'Anna Evangelista, pela oportunidade que me concedeu, pela paciência e dedicação em meu aprendizado.

RESUMO

FERREIRA, Marília Marcondes. **Treinamento físico aeróbio e prevenção da doença hepática gordurosa não alcoólica**: papel da lipogênese e do estresse de retículo no fígado. 2019. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Versão corrigida.

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) pode ser prevenida pelo treinamento físico aeróbio (TFA) através do aumento da sensibilidade à insulina e redução dos estoques de lipídios, e um dos mecanismos envolvidos nessa resposta pode ser a redução da lipogênese hepática e do estresse de retículo (EsR). O presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que o TFA previne a DHGNA por meio da redução da lipogênese hepática e melhora do EsR. Para isso, camundongos machos adultos C57BL6/J foram separados em grupos (n= 9-10/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, 1h por dia, 5 vezes por semana, durante 8 semanas. Foi observado que os grupos TF-NO e TF-CAF aumentaram a velocidade máxima no teste de esforço físico, e tiveram menor peso corporal comparados ao SED-CAF. O peso do fígado e a média do consumo alimentar foram menores nos grupos TF-NO, TF-CAF e SED-CAF comparados ao SED-NO. O consumo hídrico médio dos grupos TF-CAF e SED-CAF foi menor comparado ao SED-NO. A atividade da enzima G6PDH aumentou no grupo TF-NO comparado ao SED-NO. Não houve diferença na atividade da enzima citrato sintase, na expressão das proteínas lipogênicas (FAS e DGAT2) e do FGF21. Entre as proteínas sinalizadoras de EsR, somente a expressão do ATF4 aumentou no grupo TF-NO comparado ao TF-CAF, enquanto a t-PERK, p-PERK, t-eIF2 α e p-eIF2 α não modificaram. Não foi observada presença de EHNA. Em conclusão, o TFA aumenta a capacidade aeróbia, reduz o peso corporal e previne a DHGNA independente de alterações na atividade lipogênica hepática e na resposta de EsR.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não alcoólica. Treinamento físico aeróbio. Lipogênese. Estresse de retículo.

ABSTRACT

FERREIRA, Marilia Marcondes. **Aerobic exercise training and the prevention of non-alcoholic fatty liver disease**: role of lipogenesis and reticulum stress in the liver. 2019. 66 p. Dissertation (Master of Science) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2019. Corrected version.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) can be prevented by aerobic exercise training (AET) through increases in insulin sensitivity and reduction in lipid stores. One of mechanisms involved in this response may be the reduction of hepatic lipogenesis and reticulum stress (EsR). The present study aimed to test the hypothesis that AET prevents NAFLD by reducing hepatic lipogenesis and improving EsR. For this, C57BL6/J adult male mice were separated into groups sedentary (SED) fed a normocaloric diet (CHOW-SED) or cafeteria diet (CAF) (CHOW-SED and CAF-SED, respectively) and trained (TR) fed NO or CAF diet (CHOW-TR and CAF-TR, respectively). The AET was performed at 60% of the maximum capacity, 1 time per day, 5 times per week for 8 weeks. It was observed that CHOW-TR and CAF-TR groups increased the maximum speed in the physical exercise test and had a lower body weight compared to CAF-SED. The liver weight and the food intake mean were lower in CHOW-TR, CAF-TR and CAF-SED groups compared to CHOW-SED. The average of water intake in the CAF-TR and CAF-SED groups was lower compared to CHOW-SED. The G6PDH activity increased in the CHOW-TR group compared to CHOW-SED. There was no difference in citrate synthase activity, in the expression of lipogenic proteins (FAS and DGAT2) and FGF21. Among the EsR signaling proteins, only ATF4 showed significant increase in the CHOW-TR group compared to CAF-TR, while t-PERK, p-PERK, t-eIF2 α and p-eIF2 α did not change. No presence of NASH was observed. In conclusion, AET improves aerobic performance, reduces body weight and prevents NAFLD independent of changes in the hepatic lipogenic activity and EsR response.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease. Aerobic exercise training. Lipogenesis. Reticulum stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Componentes da via lipogênica.....	17
Figura 2	Componentes das vias de ativação da UPR.....	21
Figura 3	Evolução da ativação crônica da UPR.....	22
Figura 4	Conteúdo de lipídeo hepático.....	24
Figura 5	Desenho experimental do projeto.....	28
Figura 6	Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico realizado pré-protocolo experimental.....	34
Figura 7	Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico realizado na 8ª semana de protocolo experimental.....	35
Figura 8	Média do consumo alimentar em grama (A), média do consumo alimentar em quilocaloria (B), consumo alimentar por semana (C).....	37
Figura 9	Média do consumo hídrico (A), consumo hídrico por semana (B).....	38
Figura 10	Atividade máxima da enzima citrato sintase.....	39
Figura 11	Atividade da enzima G6PDH.....	40
Figura 12	Expressão proteica da FAS no fígado.....	40
Figura 13	Expressão proteica da DGAT2 no fígado.....	41
Figura 14	Expressão proteica de FGF21 no fígado.....	42
Figura 15	Expressão proteica da PERK (A), expressão proteica da p- PERK (B) no fígado.....	43
Figura 16	Expressão proteica da eIF2 total (A), expressão proteica da p- eIF2α (B) no fígado.....	44
Figura 17	Expressão proteica do ATF4 no fígado.....	45
Figura 18	Fotos representativas de cortes histológicos corados com HE no aumento de 40x.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos experimentais.....	27
Tabela 2	Composição nutricional e valor energético das dietas.....	28
Tabela 3	Índice de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAS).....	33
Tabela 4	Peso corporal, índice de Lee e peso do fígado.....	36
Tabela 5	Análise histológica do fígado por grupo experimental.....	46
Tabela 6	Deposição de lipídios no tecido hepático (% de lipídio / área)	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC	Ácido graxo carboxilase
FAS	Ácido graxo sintase
ACS	Acil-CoA sintetase
ACL	ATP citratoliase
ATF4	do inglês, <i>activating transcription factor 4</i>
ATF6	do inglês, <i>activating transcription factor 6</i>
BiP/GRP78	do inglês, <i>binding protein/glucose regulated protein 78</i>
CHOP/EBP	do inglês, <i>(C/EBP CCAAT/enhancer binding protein)</i>
JNK	c-Jun N-terminal kinase
NADPDH	co-fator fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DHGA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EHNA	Esteatose hepática não alcoólica
EsR	Estresse de retículo
FGF21	Fator de crescimento de fibroblastos 21
SREB1c	Fator de transcrição de proteínas ligantes aos elementos regulados por esteroides
GPAT	Glicerol-3 fosfato aciltransferase
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Hsp 70H	Proteína de choque térmico 70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 METABOLISMO DE LIPÍDEOS NO FÍGADO.....	16
2.2 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA DHGNA.....	18
2.3 EFEITOS DO TFA E PREVENÇÃO DE DOENÇAS METABÓLICAS.....	23
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 GERAL.....	26
3.2 ESPECÍFICO.....	26
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 AMOSTRA.....	26
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL DO PROJETO.....	27
4.3 DIETAS ALIMENTARES.....	28
4.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO (TFA).....	29
4.5 TESTE DE ESFORÇO FÍSICO MÁXIMO.....	29
4.6 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	29
4.7 CONSUMO DE RAÇÃO E INGESTÃO DE ÁGUA.....	30
4.8 PROCEDIMENTOS DE MORTE E COLETA.....	30
4.9 DOSAGENS ENZIMÁTICAS.....	30
4.10 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....	31
4.11 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA HEPÁTICA.....	32
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 RESULTADOS.....	34
5.1 CAPACIDADE FÍSICA.....	34

5.2 PESO CORPORAL E DO TECIDO HEPÁTICO.....	35
5.3 CONSUMO DE RAÇÃO.....	36
5.4 CONSUMO HÍDRICO.....	38
5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	39
5.6 EXPRESSÃO PROTEICA.....	40
5.7 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS.....	45
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

A prevalência de doenças crônicas metabólicas está crescendo de forma alarmante na população. O aumento da adiposidade corporal e os prejuízos na ação da insulina estão associados com diversos problemas de saúde, tais como resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), doenças hepatobiliares e da vesícula biliar, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, asma e uma variedade de cânceres (HOTAMISLIGIL, 2006; HOTAMISLIGIL, 2010; BEDOSSA, 2016).

Tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento apresentam aumentos drásticos de indivíduos obesos e com DM2 (KOVESDY et al., 2017), e de acordo com dados publicados na literatura, 475 milhões de adultos são obesos e 1,5 bilhões apresentam sobrepeso no mundo (PAN et al., 2014). No Brasil, segundo os dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2018), 19,8% da população adulta apresentam obesidade.

A crescente prevalência de DM2 está intimamente ligada ao aumento da obesidade, pois aproximadamente 90% dos casos de DM2 são associados ao excesso de peso. Além disso, aproximadamente 197 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam intolerância à glicose devido à obesidade e aos fatores associados com a síndrome metabólica. Expectativas não muito favoráveis projetam aumento de DM2 para 420 milhões em 2025, revelando que o DM2 pode tornar-se uma pandemia até 2030 (PARVEZ et al., 2007; NG et al., 2014). Atualmente, no Brasil, 7,7% da população é diabética (VIGITEL, 2018).

A obesidade, a resistência à insulina e o DM2 estão amplamente associados com prejuízos morfofuncionais hepáticos característicos DHGNA. A DHGNA engloba um espectro de modificações hepáticas que vão desde um simples depósito de gordura no interior do hepatócito, sem inflamação ou fibrose, típico de processo de esteatose simples, até casos de esteatose hepática não alcoólica (EHNA), cirrose e carcinoma hepatocelular em pacientes sem história de etilismo (OLSON et al., 2016; BRIL; CUSI, 2017). A DHGNA tem se tornado cada vez mais comum em todas as populações, no entanto, a prevalência em indivíduos obesos é de 80% (WYATT et al., 2006; MAGRI et al., 2019).

Já a EHNA, que é uma das doenças do fígado mais comum associada à dislipidemia, DM2 e obesidade (NI et al., 2016; CUI et al., 2016), apresenta prevalência estimada de aproximadamente 30% da população no mundo (AL-JIFFRI et al., 2013; KUCERA et al., 2014). O excesso de peso é uma das principais causas de EHNA, sendo responsável por 60% dos casos (VIGITEL, 2018). A EHNA não afeta somente o fígado, mas também aumenta o risco de desenvolver doenças extra-hepáticas, incluindo doenças cardiovasculares e doença renal crônica. A EHNA aumenta drasticamente a resistência à insulina, predispõe à dislipidemia aterogênica e promove a liberação de diversos fatores pró-inflamatórios, pró-trombóticos e pró-fibrogênicos que podem promover danos vasculares e renais (TARGHE; BYRNE, 2017).

O consumo de dietas desbalanceadas e ricas em calorias junto com a inatividade física estão entre as principais causas de obesidade, distúrbios do metabolismo de glicose e danos hepáticos (KAWAGUCHI et al., 2011; WANG et al., 2016; MALONE; HANSEN, 2018). Por outro lado, o treinamento físico aeróbio (TFA) tem sido amplamente recomendado para a prevenção e o tratamento de doenças metabólicas, principalmente em função dos efeitos benéficos no controle de peso corporal, da adiposidade e do metabolismo glicêmico (PESSIN et al., 2000; HIGA et al., 2014; AMÉRICO et al., 2019; LA FUENTE et al., 2019). No mais, o TFA é eficaz para reduzir a EHNA, conforme demonstrado por GHAREGHANI et al. (2017) em camundongos treinados por 10 semanas. Esse estudo também observou redução no peso corporal, na glicemia de jejum, triglicérides e na expressão de genes lipogênicos do fígado.

Considerando o potencial do TFA para a prevenção de doenças metabólicas, o presente trabalho foi delineado para investigar alguns dos mecanismos pelos quais o TFA pode prevenir a DHGNA em um modelo de animal que desenvolve obesidade e resistência à insulina por meio da dieta de cafeteria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO DE LIPÍDIOS NO FÍGADO

O fígado é considerado um dos órgãos centrais na regulação do metabolismo lipídico, sendo capaz de absorver ácidos graxos circulantes, esterificar, oxidar e exportar lipídios (NGUYEN et al., 2008). Isso permite ao corpo manter suas funções em diferentes situações, tais como após alimentação, no jejum e sob demanda energética durante a prática de exercício físico (OOSTERVEER; SCHOONJANS, 2013). Este tecido possui um componente estrutural básico chamado de célula hepática ou hepatócito, considerada a célula mais versátil do organismo com funções endócrinas e exócrinas. Os hepatócitos podem acumular, eliminar toxinas e transportar diversas substâncias, além de sintetizar proteínas para sua própria manutenção. Além disso, estão entre os poucos tipos de células capazes de consumir e produzir glicose (MITHIEUX, 2010; TREFTS et al., 2017).

As principais ações metabólicas envolvendo os lipídios são denominadas de lipólise (hidrólise de triglicerídeos) e lipogênese (armazenamento de triglicerídeos na gotícula de lipídio). Na lipólise ocorre a hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol através de diferentes etapas, com ação de catecolaminas e lipases (GASTALDELLI et al., 1999; NATALI et al., 1998; WEISZENSTEIN et al., 2016). A primeira etapa se inicia com a ação das catecolaminas nos receptores beta-adrenérgicos, e posterior ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila a lipase hormônio sensível (LHS) nos resíduos de serina 563, 659 e 660 e as perilipinas (SZTALRYD et al., 2003; MA et al., 2015) para que possa ocorrer a hidrólise de triglicerídeos. Além da HSL, a lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) e lipase de monoacilglicerol (MAGL) exercem papéis importantes na hidrólise de triglicerídeos, na qual a ATGL também participa na fase inicial da hidrólise de triglicerídeos clivando o primeiro ácido graxo e a MAGL finaliza a hidrólise clivando o último ácido graxo do diacilglicerol (SAPONARO et al., 2015; KIM et al., 2014).

O processo lipogênico clássico ocorre por meio da biossíntese de triglicerídeo a partir da esterificação de ácidos graxos complexados com coenzima A (CoA) com glicerol-3-fosfato (Figura 1). Uma vez dentro da célula, o ácido graxo é acilado com CoA formando acil-CoA pela acil-CoA sintetase (ACS) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). A acil-CoA juntamente com glicerol-3-fosfato, que é obtido da via glicolítica, são esterificados em triglicerídeos pela ação das enzimas glicerol-3 fosfato

aciltransferase (GPAT) e diacilglicerol aciltransferase (DGAT) (SAPONARO et al., 2015). Quando os processos metabólicos que resultam na biossíntese e incorporação de triglicerídeos nas gotículas de gordura do adipócito ocorrem a partir de substratos diferentes de lipídios, a lipogênese passa a ser denominada por *de novo* (Figura 1). Nesse caso, ocorre a conversão da citrato em acetil-CoA pela enzima ATP citratoliase (ACL). Acetil-CoA é convertida a malonil-CoA pela enzima ácido graxo carboxilase (ACC), que será utilizada como substrato para síntese de triglicerídeo pela enzima ácido graxo sintase (FAS) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006, SAPONARO et al., 2015; WEISZENSTEIN et al., 2016). Além disso, existe outra via metabólica paralela à via glicolítica denominada de *shunt* das pentoses, que é ativada pelo excesso de metabólitos proveniente da via glicolítica. Essa via é alternativa para a oxidação da glicose-6 fosfato sob ação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), gerando como um dos produtos, o co-fator fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH), que é fundamental para a ação da FAS na via lipogênica (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Figura 1- Componentes da via lipogênica. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P); acil-CoA sintetase (ACS); ATP citratoliase (ACL); ácido graxo carboxilase (ACC); ácido graxo sintase (FAS); glicerol-3 fosfato aciltransferase (GPAT); diacilglicerol aciltransferase (DGAT); diacilglicerol aciltransferase (DGAT). Adaptado de SAPONARO et al. (2015); BELEW et al. (2019).

A lipogênese *de novo* ocorre principalmente após o consumo elevado de carboidratos, onde apenas parte desse carboidrato é armazenado como glicogênio hepático enquanto o excesso é convertido em ácido graxo (HELLERSTEIN, 1999; VIEGAS et al., 2016). Essa via é crucial para o equilíbrio entre lipólise e lipogênese, contudo o aumento da lipogênese *de novo* contribui para síntese e depósito de triglicerídeos hepáticos, favorecendo o desenvolvimento da DHGNA (DONNELLY et al., 2005; SAPONARO; GASTALDELLI, 2015; BELEW et al., 2019).

A maior deposição de lipídios no fígado está associada tanto com o aumento na atividade de proteínas lipogênicas quanto com a diminuição de proteínas lipolíticas e oxidativas. O fator de transcrição de proteínas ligantes aos elementos regulados por esteróides (SREB1c), que é um dos responsáveis pela síntese de colesterol, quando elevado no fígado, favorece a síntese de lipídios através da ativação de genes lipogênicos como da FAS, ACC e DGAT2 (SCHULTZ et al., 2012; OLIVA et al., 2012; YASARI et al., 2012; CINTRA et al., 2012; ANGULO et al., 2015). Em um estudo feito por AHN et al. (2014), foi observado que amostras de sangue de 40 pacientes com EHNA apresentaram níveis de SREB1c maiores comparados ao grupo controle. Em outro estudo, foi observado que o comprometimento da atividade da DGAT2 resulta no aumento de diacilgliceróis hepáticos, deixando os hepatócitos mais suscetíveis a lesões por estresse oxidativo e progressão da DHGNA (PERRY et al., 2014). Por outro lado, a diminuição de proteínas oxidativas como o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ) e a quinase ativada por AMP (AMPK) prejudicam a oxidação de lipídios, comprometendo a homeostase lipídica hepática, aumentando os estoques lipídios no tecido (KIM et al., 2014).

2.2 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA DHGNA

O acúmulo de lipídios em diferentes tecidos no organismo é um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de doenças metabólicas. No fígado, danos causados pelo excesso de lipídios podem levar à resistência à insulina e EHNA (FRAULOB et al., 2010; CHEN et al., 2019; LA FUENTE et al., 2019). Embora diferentes mecanismos fisiopatológicos tenham sido descritos na literatura, prejuízos no funcionamento do retículo endoplasmático (RE) dos hepatócitos, típicos do estresse de retículo (EsR), pode ser um dos precursores da EHNA, inflamação,

resistência à insulina, estresse oxidativo e a morte de hepatócitos (PASSOS et al., 2005; BOZAYKUT et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

O RE consiste em uma rede de membranas responsável pelo tráfego de ampla gama de proteínas, sendo considerado um sítio principal de síntese proteica, maturação e, com o auxílio do Complexo de Golgi, de transporte e liberação de proteínas corretamente enoveladas (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2007; HOTAMISLIGIL, 2008). O enovelamento de proteínas no RE é mediado por chaperonas moleculares que proporcionam ambiente favorável para o enovelamento. (KAUFMAN, 1999; HU et al., 2006; BAICEANU et al., 2016). Como o RE desempenha papel fundamental na integração de vários sinais metabólicos na homeostase celular, é de suma importância para a célula manter a função do RE adequada (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2007; HOTAMISLIGIL, 2008; OAKES; PAPA, 2015). No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de proteína e a capacidade de enovelamento, há um acúmulo de proteínas mal formadas que geram o EsR (PRELL et al., 2013). A obesidade está associada ao desenvolvimento de EsR predominantemente em células hepáticas e adiposas, sendo este um dos mecanismos fisiopatológicos da resistência à insulina e do DM2 (OZCAN et al., 2004; LEBEAUPIN et al., 2018).

O EsR induzido por obesidade está associado à respostas inflamatórias principalmente através de vias de sinalização como da proteína c-Jun N-terminal kinase (JNK) e da enzima I κ B Kinase beta (IKK β) (HU et al., 2006; HOTAMISLIGIL, 2008), as quais prejudicam a sinalização da insulina (OZCAN et al., 2004; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005; MOORE; OAKES, 2017), e portanto, induzem a resistência à insulina (OZCAN et al., 2004; ZHANG et al., 2008). A inflamação e o EsR estão ligados em vários níveis, pois são sistemas adaptativos de curto prazo necessários para a função e sobrevivência do organismo. Ambos são prejudiciais quando cronicamente ativados (HOTAMISLIGIL, 2010; OAKES; PAPA, 2015).

Situações de estresse celular, como as que ocorrem por ingestão excessiva de gordura e hiperglicemia, podem alterar profundamente a homeostase do RE e desencadear uma resposta a esse desequilíbrio, conhecida como *unfolded protein response* (UPR). A ativação da UPR é necessária para o reestabelecimento da função normal do RE, pois é fundamental para reduzir a tradução de novas proteínas e aumentar o enovelamento de proteínas já sintetizadas por chaperonas, diminuindo assim, o acúmulo de proteínas disfuncionais.

A UPR é mediada por três proteínas transmembrânicas, a *inositol-requiring1 alpha* (IRE1 α), a *protein kinase-like ER kinase* (PERK) e a *activating transcription factor 6* (ATF6) (Figura 2). Cada uma dessas proteínas se associa à chaperona BiP/GRP78 (*binding protein/glucose regulated protein 78*), membro da Hsp 70 (*heat shock protein 70*) no seu estado inativo. Após o acúmulo de proteínas mal formadas no lúmen do RE, a ATF6, a IRE1 α e a PERK se dissociam da BiP/GRP78 e são ativadas, levando à expressão de genes como XBP1 (*X Box binding protein 1*), CHOP/EBP [*C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) homologous protein*], e *activating transcription factor 4* (ATF4), os quais codificam proteínas para aumentar a capacidade de enovelamento das proteínas no RE (DELDICQUE et al., 2013; LEBEAUPIN et al., 2018). Juntas, essas três vias atenuam o EsR através da redução da síntese proteica, facilitando a degradação de proteína e o aumento de chaperonas (HOTAMISLIGIL, 2010; LI et al., 2018).

As duas principais moléculas de sinalização do EsR são a PERK e eIF2 α . A PERK é ativada por trans-autofosforilação e oligomerização. Na forma ativa, a p-PERK inativa o eIF2 α por fosforilação e, com isso, o p-eIF2 α inibe a tradução de proteínas de forma geral, com intuito de prevenir o acúmulo de mais proteínas mal formadas ou disfuncionais (Figura 2). Em células hepáticas humanas, os ácidos graxos induzem o EsR e a apoptose através da via PERK-ATF4-CHOP (CAO et al., 2012). Durante o processo de montagem e enovelamento de proteína pelo RE, a fosforilação de eIF2 α pela PERK é fundamental, pois resulta na ativação do ATF4, que é considerado o principal indutor da CHOP (SHORE et al., 2011; PASSOS et al., 2015; LEBEAUPIN et al., 2018). A CHOP, por sua vez, aciona a atividade do NF- κ B, que é um complexo proteico com inúmeras funções incluindo a regulação das respostas inflamatórias (HOTAMISLIGIL, 2010; LI et al., 2018) (Figura 2). O estado de fosforilação da PERK e da eIF2 α é um indicador chave da presença do EsR, podendo ser observado um aumento desses indicadores de estresse nos tecidos adiposo e hepático de camundongos obesos (OZCAN et al., 2004; GUO et al., 2018).

Figura 2- Componentes das vias de ativação da UPR. Adaptada de PASSOS et al. (2015); LEBEAUPIN et al. (2018).

A falha na resposta de UPR resulta em aumento do estado inflamatório, desenvolvimento de doenças e apoptose celular (SZEGEZDI et al., 2003; DELDICQUE et al., 2013). No fígado, quando a UPR é ativada de maneira crônica e o EsR não é revertido, pode-se observar aumento na deposição de lipídios, inflamação, morte dos hepatócitos e, em casos mais severos, desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (LEBEAUPIN et al., 2018). A evolução da ativação crônica da UPR no fígado e possíveis desfechos clínicos estão resumidos na Figura 3.

Figura 3- Evolução da ativação crônica da UPR. Adaptada de LEBEAUPIN et al. (2018).

A relação entre EsR e metabolismo lipídico tem sido amplamente discutida na literatura. Sabe-se que o EsR ativa a expressão do fator de transcrição SREBP1c, fundamental para a lipogênese (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2007). De acordo com LEBEAUPIN et al. (2018), o EsR crônico como observado na presença de DHGNA, pode afetar diretamente o metabolismo de lipídios no fígado por meio da indução da lipogênese *de novo*, alterações na secreção de VLDL e sinalização de insulina, podendo levar a autofagia. Além disso, ZHU et al. (2019) observaram que camundongos alimentados com dieta hipercalórica apresentaram aumento nos níveis de triglicerídeos, HDL e de insulina, bem como na expressão da GRP78 e da JNK no tecido adiposo subcutâneo. Tais achados mostram que a associação entre o EsR e o metabolismo de lipídios acontece em outros tecidos também, como por exemplo, no tecido adiposo branco.

Embora a associação entre EsR, lipogênese e DHGNA possa ser estabelecida através de diferentes mecanismos, dados recentes revelaram o papel do fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) nesse processo. Sendo uma proteína da família FGF, o FGF21 está envolvido em uma ampla variedade de processos metabólicos como aumento na sensibilidade à insulina, na absorção de glicose, na oxidação lipídica, além de inibição da lipogênese (SALMINEN et al., 2017). A maior

fonte de FGF21 é o fígado, seguido pelo tecido adiposo, músculo esquelético e células β -pancreáticas (YANG et al., 2012). A literatura aponta que a expressão de FGF21 no fígado é regulada pelo PPAR- α , pelo receptor hepático X (LXR) e por condições nutricionais como estado pós-prandial (POHL et al., 2017).

Prejuízos na expressão hepática do FGF21 em ratos estão associados com a obesidade (FISHER et al., 2010; SO et al., 2013). Nos estudos com administração exógena de FGF21, foram observadas melhoras na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina em roedores e macacos diabéticos (COSKUN et al., 2008; XU et al., 2009; WU et al., 2011; FOLTZ et al., 2012), redução na lipogênese hepática de camundongos (JIANG et al., 2014), e reversão da EHNA em camundongos, indicando que a ação dessa proteína no fígado pode proteger contra os distúrbios do metabolismo lipídico na DHGNA (XU et al., 2018). Porém, os dados na literatura são contraditórios, pois um estudo clínico transversal em humanos demonstrou aumento dos níveis de FGF21 proporcional a gravidade da DHGNA (LI; ZHANG; JIA, 2013). O aumento na expressão de FGF21 foi também demonstrado em biópsias hepáticas de pacientes com DHGNA (LI et al., 2010). Além disso, os níveis séricos de FGF21 estão aumentados em pacientes com DHGNA, e de forma ainda mais elevada em pacientes com síndrome metabólica (SHEN et al., 2013).

Considerando que a redução da lipogênese é fundamental para o controle da UPR e do EsR hepático, e que a ativação do FGF21 suprime a lipogênese, é possível que a prevenção da DHGNA esteja associada com a redução da atividade lipogênica induzida pelo aumento do FGF21. Nesse sentido, a investigação de estímulos capazes de aumentar a expressão do FGF21 e de reduzir a atividade lipogênica pode contribuir para elucidar possíveis mecanismos envolvidos na prevenção de EsR e DHGNA.

2.3 EFEITOS DO TFA E PREVENÇÃO DE DOENÇAS METABÓLICAS

Sabe-se que o TFA melhora a sensibilidade à insulina, reduz o tecido adiposo visceral e a EHNA em modelos de animais obesos induzidos por dieta rica em gordura, além de impedir o aumento da NF- κ B, da fosforilação de JNK e I κ B no fígado e no tecido adiposo (VAN et al., 2010; DA LUZ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; BRADLEY et al., 2018). Além disso, o TFA promove aumento da sensibilidade à insulina e melhora da glicemia em seres humanos (ZIERATH, 2002; FROSIG et al.,

2007; DE OLIVEIRA et al., 2019). SRIWIJITKAMOL et al. (2006) mostraram redução de marcadores inflamatórios em músculos de indivíduos com DM2 após 8 semanas de TFA.

O nosso grupo de pesquisa tem investigado há alguns anos os mecanismos pelos quais o TFA previne a obesidade e a resistência à insulina. Para isso, foi desenvolvido um modelo experimental de camundongo que desenvolve obesidade e resistência à insulina sistêmica por meio de dieta de cafeteria (HIGA et al., 2014a), e posteriormente, foi estudado a participação do tecido adiposo branco na prevenção de tais doenças (HIGA et al., 2014b; AMÉRICO et al., 2019), bem como os efeitos da dieta de cafeteria e do TFA nas características morfofuncionais dos rins (MULLER et al., 2018). Observou-se também que o TFA preveniu o aumento da deposição lipídica no fígado, conforme dado demonstrado na Figura 4 e ainda não publicado (LIMA, 2017), o que despertou grande interesse para a investigação de possíveis mecanismos envolvidos nessa resposta. Dessa forma, considerando que mudanças na deposição lipídica tecidual são derivadas do balanço entre síntese (atividade lipogênica) e oxidação, um dos possíveis mecanismos induzidos pelo TFA contra a DHGNA poderia ser a redução da atividade lipogênica hepática. E, por isso, um dos alvos de investigação no presente estudo foi a atividade de marcadores lipogênicos.

Figura 4- Conteúdo de lipídeo hepático (n=8 /grupo). *p≤ 0,05 vs. SED-CAF.

Estudos mostraram que o TFA tem o potencial de modular vários mecanismos relacionados à síndrome metabólica e à EHNA, tais como diminuição do estresse oxidativo e da inflamação, aumento da sensibilidade à insulina e reversão da

disfunção mitocondrial (PASSOS et al., 2015; BANITALEBI et al., 2019). Além dos benefícios já expostos, THYFAULT et al. (2009) relataram que camundongos com capacidade aeróbica elevada, reduzem a suscetibilidade ao desenvolvimento e progressão da EHNA, e GHAMARCHEHREH et al. (2019) verificaram que oito semanas de TFA promoveram redução de LDL e aumento de HDL em pacientes com DHGNA.

Enquanto a DHGNA tem como característica o acúmulo de lipídios, o TFA age na direção oposta ao promover a redução dos estoques dos lipídios nos tecidos. HUANG et al. (2017) mostraram que o TFA de cinco semanas preveniu a EHNA através da redução de genes lipogênicos (ATP-citrato liase, ACC, FAS e esteroil coenzima A dessaturase 1 (Scd1). Outro estudo comprovou a ação do TFA contra a lipogênese através da redução da proteína SREBP1c, e que este seria um importante mecanismo associado à reversão da EHNA (CINTRA et al., 2012). Além disso, LA FUENTE et al. (2019) mostraram que o TFA resgata o dano hepático diminuindo o tamanho da gotícula de lipídio no fígado.

Evidência na literatura mostra o efeito do TFA sobre marcadores de EsR e as consequências positivas para a prevenção de doenças metabólicas induzidas por dietas hipercalóricas em animais de experimentação. DA LUZ et al. (2012) observaram redução na expressão protéica de p-eIF2 α e p-PERK em ambos os tecidos adiposo e hepático de ratos treinados alimentados com dieta hipercalórica comparados aos sedentários com a mesma dieta. Esse resultado confirma a redução do EsR pelo TFA, e mais interessante, que foi associado à melhora na sinalização da insulina e redução da resistência à insulina. No entanto, em outro estudo posterior, DELDICQUE et al. (2013) observaram que camundongos alimentados com dieta hipercalórica e submetidos ao TFA apresentaram aumento na expressão das proteínas PERK no músculo sóleo e no fígado, BiP no músculo tibial anterior e a MBTPS2 no pâncreas. Também foi observado o aumento da BiP e CHOP no fígado de camundongos depois de 4 semanas de TFA (KRISTENSEN et al., 2018).

Se o EsR está envolvido no desenvolvimento da DHGNA, o TFA pode prevenir a DHGNA através da redução do EsR induzido pelo acúmulo de lipídio no fígado. No mais, se a ativação do FGF21 pode exercer efeito anti-lipogênico, é possível que o TFA reduza a lipogênese por meio do aumento da expressão do FGF21. Neste sentido, foi demonstrado que o TFA induz aumento nos níveis circulantes de FGF21 em camundongos e seres humanos (CUEVAS-RAMOS et al., 2012; KIM et al., 2013;

KEIHANIAN et al., 2019). Além disso, camundongos submetidos ao TFA com deficiência de FGF21 não apresentaram melhora nos níveis de EHNA e tolerância à glicose comparados aos camundongos controles (LOYD et al., 2016). Esses dados apontam o efeito do TFA sobre o FGF21, mas novos estudos ainda são necessários para elucidar a associação entre FGF21, lipogênese, EsR, e prevenção da DHGNA.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Testar a hipótese de que o TFA previne a DHGNA por meio da redução da lipogênese hepática e melhora do EsR.

3.2 ESPECÍFICOS

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

- marcadores de lipogênese hepática;
- marcadores de estresse de retículo no fígado;
- marcadores histológicos de danos hepáticos.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRA

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (n=38), machos, adultos (8 semanas de vida), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. Os camundongos foram separados aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com dieta e se submetidos ou não ao treinamento físico: dieta normocalórica (NO), dieta de cafeteria (CAF), sedentário (SED) e treinado (TF). Dessa forma, os grupos estudados foram: sedentário com dieta normocalórica (SED-NO, n=10), treinado com dieta normocalórica (TF-NO, n=9), sedentário com dieta de cafeteria (SED-CAF, n=9), treinado com dieta de cafeteria (TF-CAF, n=10). (TABELA 1). Todos os animais foram mantidos em local com temperatura ambiente entre 22- 24°C. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética

em Pesquisa da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP, protocolo número 002/2018.

Tabela 1- Grupos experimentais

Grupos	Dieta normocalórica	Dieta cafeteria
Sedentário	SED-NO (n=10)	SED-CAF (n=09)
Treinado	TF-NO (n=09)	TF-CAF (n=10)

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL DO PROJETO

Os experimentos realizados no presente projeto estão resumidos na Figura 5. Antes do início do protocolo experimental, todos os animais foram submetidos às análises de peso corporal e teste de esforço físico máximo. Em seguida, o TFA e a administração da dieta de cafeteria foram iniciados simultaneamente. Na quarta semana do protocolo experimental, os grupos treinados (TF-NO e TF-CAF) foram submetidos novamente ao teste de esforço físico máximo para ajuste da intensidade do TFA. No final da oitava semana do protocolo experimental, todos os animais foram novamente submetidos ao teste de esforço físico máximo. Ao longo do protocolo experimental, o peso corporal, o consumo de ração e a ingestão de água foram avaliados semanalmente. Quarenta e oito horas após a última sessão de TFA, das quais as oito horas finais foram feitas em jejum, os animais foram submetidos ao procedimento de morte, e posteriormente foram realizadas as avaliações *in vitro*.

Figura 5- Desenho experimental do projeto.

4.3 DIETAS ALIMENTARES

A dieta de cafeteria foi preparada com 10g de chocolate ao leite derretido, 15g da ração convencional triturada, 10g de amendoim torrado triturado, 5g de bolacha de maisena triturada e 5g de açúcar refinado (TABELA 2). Essa dieta é eficaz para induzir resistência à insulina e aumento de adiposidade, conforme demonstrado em estudo prévio do nosso grupo (HIGA et al., 2014a). A dieta controle foi feita através de ração industrializada padrão (Nuvilab, Paraná, Brasil).

Tabela 2- Composição nutricional e valor energético das dietas (porção de 45g).

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

4.4 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO (TFA)

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

4.5 TESTE DE ESFORÇO FÍSICO MÁXIMO

Na semana que antecedeu o primeiro teste de esforço físico máximo, os animais foram adaptados na esteira rolante com caminhada (0,2 – 0,4 Km/h) de 5 minutos por dia, durante 4 dias. Posteriormente, a capacidade de execução de exercício físico foi avaliada antes, na semana 4 e após o TFA através de um teste progressivo escalonado em esteira rolante, sem inclinação até a exaustão (FERREIRA; ROLIM; BARTHOLOMEU, 2007). A velocidade inicial da esteira foi de 0,4 km/h, e a cada três minutos, a velocidade 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 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Ao longo de todo protocolo experimental, a pesagem corporal foi realizada semanalmente em balança digital (Gehaka/modelo BG4001, São Paulo, Brasil). A determinação do ganho de peso corporal semanal dos animais foi calculada pela diferença entre o peso corporal final (semana 8) e o peso corporal inicial (semana 0).

4.7 CONSUMO DE RAÇÃO E INGESTÃO DE ÁGUA

O consumo de ração e a ingestão de água foram avaliados em grupos de animais mantidos na mesma caixa (4 a 5 animais) ao longo de todo protocolo experimental, durante períodos de 24 horas, por 3 dias consecutivos de cada semana. Utilizamos a média dos 3 dias avaliados para determinar o consumo de ração diário em gramas/animal e ingestão de água em mililitros/animal.

4.8 PROCEDIMENTOS DE MORTE E COLETA

Os animais foram submetidos ao procedimento de morte 48 horas após a última sessão de TFA. Para isso, os animais permaneceram 8 horas em jejum e, em seguida, foram anestesiados por injeção i.p. de Tiopental de Sódio (4mg / 100g de peso corporal). No momento em que o animal não demonstrou sinais de reflexo nas patas traseiras, foi feita a pesagem em balança digital, e em seguida, foi posicionado sob uma régua para a medida do comprimento naso-anal que serviu para a determinação do Índice de Lee através da fórmula: ($\sqrt[3]{\text{peso corporal/comprimento naso-anal}}$) (BERNARDIS; PATTERSON, 1968). Na sequência, foi iniciada a coleta do sangue através de punção na veia cava inferior. Finalmente, o fígado foi coletado, pesado e armazenado para as análises posteriores. Após o procedimento de coleta, as carcaças foram congeladas e armazenadas no biotério para posterior incineração realizada por uma empresa especializada.

4.9 DOSAGENS ENZIMÁTICAS

Para a dosagem da enzima lipogênica G6PDH, aproximadamente 100mg de tecido hepático foram suspensos em tampão de extração (na proporção de 1:1 peso/volume) contendo sacarose (250 mM), EDTA (1mM), DTT (1 mM), leupeptina (50 μ M) e aprotinina (5 μ M) pH=7.4. O material mantido em gelo foi homogeneizado em Polytron (PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucene, Suíça) por 10 segundos em velocidade máxima, centrifugado (15000rpm, 15 minutos, 0°C em Centrífuga 5417 C/R- Eppendorf) para separação dos restos celulares e lipídicos.

Para a atividade da G6PDH, um volume de 15 μ L do infranadante da última centrifugação foi utilizado para a determinação indireta da atividade enzimática da G6PDH, como medida da produção total de NADPH pela via das pentoses-fosfato

(BERGMEYER; BENT, 1974). O tampão de ensaio (volume de 270 μ L por cubeta) foi de Tris-HCl (8,6 mM), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (6,9 mM), NADP (0,4 mM) e Triton X-100 (0,05 %, v/v), pH 7,6. A reação foi iniciada com a adição de 15 μ L de glicose-6-fosfato (1,2 mM) ao extrato enzimático, e acompanhada por 10 min a 25°C. A absorbância foi monitorada a 340 nm, sendo o coeficiente de extinção para este comprimento de onda igual a 6,22.

Para a dosagem da enzima citrato sintase, aproximadamente 100mg do tecido hepático foram suspensos em tampão de extração (na proporção de 1:1 peso/volume) contendo Tris-base (50mM) e EDTA (1mM), pH=7,4. O material mantido em gelo foi homogeneizado em Polytron (PT 3100, Kinematica AG, Littau-Lucene, Suíça) por 10 segundos em velocidade máxima, centrifugado (3000rpm, 15 minutos, 4°C em Centrífuga 5417 C/R- Eppendorf). Em seguida, o sobrenadante foi retirado para a dosagem da atividade da enzima citrato sintase, através de ensaio colorimétrico realizado em espectrofotômetro, segundo método descrito por ALP et al. (1976). A atividade foi medida a partir da quantificação do complexo formado entre a Coenzima A (CoA) liberada com o DTNB do meio e oxaloacetato. O tampão do ensaio consistiu em Tris-aminometano (50 mM), EDTA (1mM) e DTNB (0,2 mM), pH=8,1. AcetilCoA (0,1 mM) foi preparado através da adição de 1mg de AcetilCoA, 1 ml de água deionizada, 25 μ L de K_2HCO_3 e uma gota de anidrido acético. Após 10 minutos de descanso no gelo, 1 ml de Acetil CoA foi misturado com 1 ml de Triton X-100 0,05% (v/v) e 10 ml 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 20 minutos (37 °C). A absorbância foi monitorada a 412nm.

As proteínas foram quantificadas pelo método BCATM (PIERCE Biotechnology), e os resultados foram expressos em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

4.10 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

Para esse ensaio, amostras de tecido hepático foram homogeneizadas em tampão de extração fosfato (50 MM KH_2PO_4 ; 50 MM K_2HPO_4), acrescido de inibidores de fosfatases (1:300, Sigma Aldrich) e inibidor total de proteases (1:300, Sigma Aldrich) e PMSF (1:1000). A cada 1 ml de tampão foi acrescentado 10 μ L de triton (10%) em seguida, foram centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 4°C. Parte do sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína pelo kit de

ensaio protéico BCA™ (PIERCE Biotechnology) e parte foi armazenado a -80°C para posteriores análises por Western Blot. Os anti-corpos primários utilizados foram: anti-PERK (1:1000 cell signaling), anti-p-PERK (1:1000 cell signaling), anti-EIF2 α (1:1000 cell signaling), anti-p- EIF2 α (1:1000 cell signaling), anti-ATF4 (1:1000 abcam), anti-FGF21(1:1000 abcam), anti-DGAT2 (1:1000 abcam) e anti-FAS (1:1000 abcam); e secundários anti-Rabbit (1:500 abcam) e anti-Goat (1:2000 abcam). Além disso, foi utilizado como normalizador o anticorpo para β -actina e GAPDH.

A separação de proteínas foi realizada com o uso de gel de sódio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) e o processo de transferência do gel para a membrana ocorreu por meio de imersão completa de um sanduíche gel-membrana em uma solução tampão (transferência úmida).

As membranas foram bloqueadas com albumina sérica bovina 5% por 2 horas e encubadas em anticorpo primário por 48 horas em câmara fria. Após três lavagens de dez minutos com solução salina tamponada, as membranas foram novamente encubadas em anticorpo secundário por 2 horas, também em câmara fria. O sinal de membrana foi detectado através de reação da peroxidase na solução de ECL durante exposição no equipamento Image Quant LAS 4000 mini (GE HealthcareLifescience®). A intensidade de banda foi quantificada no programa Image J (versão 1.43 para Windows).

4.11 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA HEPÁTICA

Fragmentos de tecido hepático previamente fixado em solução de formoldeído a 4% foram processados (desidratação, diafanização e parafinização do material) e incluídos em parafina. Após a realização de cortes histológicos a 7 micrômetros, os cortes foram submetidos às colorações de hematoxilina-eosina (H-E). As análises foram feitas de forma cega, utilizando 10 campos por animal em um aumento de 40x. Os resultados foram obtidos por meio de microscopia óptica, com o auxílio do programa Image Pro-Plus.

Para a análise semi-quantitativa, foi utilizado o método modificado de LIANG et al. (2014), no qual consiste em um sistema de pontuação utilizado para classificar o índice de atividade da EHNA (NAS) à partir das seguintes características histológicas: esteatose (0-3), inflamação lobular (0-3) e balonização (0-2) (TABELA 3). A pontuação varia de 0 a 8, sendo que para NAS < 3 considera-se ausência de EHNA, para NAS

entre 3 e 4 considera-se provável presença de EHNA, e para $NAS \geq 5$ considera-se presença de EHNA.

Tabela 3- Índice de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAS)

Item	Definição	Score
Esteatose	< 5%	0
	5 – 33%	1
	> 33 – 66%	2
	> 66%	3
Inflamação	Sem focos	0
	< 2 focos por campo	1
	2 - 4 focos por campo	2
	> 4 focos por campo	3
Balonização	Ausente	0
	Poucas células	1
	Muitas células	2

Adaptada de LIANG et al (2014)

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5 RESULTADOS

5.1 CAPACIDADE FÍSICA

Não houve diferença na velocidade máxima atingida pelos animais na semana inicial do protocolo experimental (Figura 6). Já na 8ª semana, o teste de esforço físico revelou aumento na velocidade máxima atingida dos grupos TF-NO e TF-CAF comparado aos grupos SED-NO e SED-CAF, mostrando que o TFA aumentou a capacidade física dos animais treinados (Figura 7). O dado evidencia que o TFA foi capaz de produzir adaptações típicas do exercício aeróbio.

Figura 6- Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico realizado pré-protocolo experimental. SED-NO (n=10); TF-NO (n=9); SED-CAF (n=8); TF-CAF (n=8).

Figura 7- Velocidade máxima atingida em teste de esforço físico realizado na 8ª semana de protocolo experimental. * $p \leq 0,05$ vs. SED-NO e SED-CAF. SED-NO (n=10); TF-NO (n=9); SED-CAF (n=8); TF-CAF (n=8).

5.2 PESO CORPORAL E DO TECIDO HEPÁTICO

Não houve diferença no peso corporal entre os grupos no início do protocolo experimental (Tabela 4). O peso corporal final e o ganho de peso corporal do grupo TF-NO foram significativamente menores comparados aos grupos sedentários. Além disso, o grupo TF-CAF apresentou menor peso corporal final comparado ao grupo SED-CAF. O Índice de Lee dos animais foi avaliado e não observamos diferença entre os grupos estudados. O peso do fígado corrigido pelo peso corporal dos grupos TF-NO, SED-CAF e TF-CAF foi menor comparado ao grupo SED-NO.

Tabela 4 – Peso corporal, índice de Lee e peso do fígado

	SED NO (n=10)	TF NO (n=9)	SED CAF (n=9)	TF CAF (n=10)
PC inicial (g)	17,6 ± 0,8	18,9± 0,4	19,8± 0,6	19,1± 0,6
PC final (g)	26,8 ± 0,3	23,9 ± 0,4*	28,7± 1,0	25,4± 0,4 [#]
Ganho de PC (g)	9,2± 0,8	5,0 ± 0,6*	8,9 ± 1,2	6,3± 0,7
Índice de Lee (g/cm ³)	32,2± 0,1	31,7± 0,6	32 ± 0,3	32± 0,1
Fígado (mg/g)	1,2± 0,02	1,1± 0,04 ^{\$}	1,1± 0,03 ^{\$}	1,0± 0,02 ^{\$}

PC= peso corporal. Os dados estão apresentados na forma de média ± erro padrão.

*p<0,05 vs. SED-NO e SED-CAF; [#]p<0,05 vs. SED-CAF; ^{\$}p<0,05 vs. SED-NO.

5.3 CONSUMO DE RAÇÃO

Conforme demonstrado na Figura 8A, a média do consumo alimentar durante o protocolo experimental dos grupos TF-NO, TF-CAF e SED-CAF foi menor comparado ao grupo SED-NO. Além disso, o grupo TF-CAF também apresentou menor consumo alimentar comparado ao grupo TF-NO. O consumo alimentar em quilocalorias dos grupos TF-NO, TF-CAF e SED-CAF também foi menor comparado ao SED-NO. Porém, não foi observada diferença entre os grupos TF-CAF e TF-NO no consumo alimentar em quilocalorias. Os resultados de consumo alimentar dos grupos TF-NO, TF-CAF e SED-CAF comparado ao grupo SED-NO podem ser vistos na figura 8B, expresso em quilocaloria. A Figura 8C representa o consumo alimentar por semana, no qual não se observou diferença estatística.

Figura 8- Média do consumo alimentar em grama (A), média do consumo alimentar em quilocaloria (B), consumo alimentar por semana (C). SED-NO (n=10); TF-NO (n=9); SED-CAF (n=9); TF-CAF (n=10). *p<0,05 vs. SED-NO; #p<0,05 vs. TF-NO.

5.4 CONSUMO HÍDRICO

Na Figura 9A pode-se observar que a média do consumo hídrico dos grupos TF-CAF e SED-CAF foi menor comparada ao grupo SED-NO. Na Figura 9B está representando o consumo hídrico por semana, no qual não foram observadas diferenças entre os grupos.

Figura 9- Média do consumo hídrico (A), consumo hídrico por semana (B). SED-NO (n=10); TF-NO (n=09); SED-CAF (n=09); TF-CAF (n=10). *p<0,05 vs. SED-NO.

5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A Figura 10 mostra o resultado da atividade da enzima citrato sintase no fígado, e conforme pode ser observado, não houve diferença entre os grupos estudados.

Figura 10- Atividade máxima da enzima citrato sintase. SED-NO (n=8); TF-NO (n=7); SED-CAF (n=8); TF-CAF (n=8).

A Figura 11 apresenta o resultado da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), a qual foi 206% maior no grupo TF-NO comparado ao grupo SED-NO.

Figura 11- Atividade da enzima G6PDH. SED-NO (n=7); TF-NO (n=7); SED-CAF (n=8); TF-CAF (n=7). *p<0,05 vs. SED-NO.

5.7 EXPRESSÃO PROTEICA

Para o estudo da atividade lipogênica, foram avaliadas as expressões das proteínas FAS e DGAT2. Embora o grupo TF-CAF tenha apresentado 29% de redução na expressão da proteína FAS comparado ao grupo SED-CAF, não foi observada diferença estatística entre os grupos (Figura 12).

Figura 12- Expressão proteica da FAS no fígado (n=8/grupo).

Quanto à expressão da proteína DGAT2, apesar de o grupo TF-NO apresentar 34% de aumento na DGAT2 comparado ao grupo SED-NO, não houve diferença estatística entre os grupos estudados (Figura 13). Além disso, A Figura 14 mostra os dados da expressão de FGF21. É sabido que o fígado é o principal local de produção do FGF21 e, que tanto a dieta de cafeteria quanto o TFA podem provocar mudanças na expressão protéica do FGF21, no entanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados.

Figura 13- Expressão proteica da DGAT2 no fígado (n=4/grupo).

Figura 14- Expressão proteica de FGF21 no fígado (n=8/grupo).

Como sinalizadoras de EsR, foram avaliadas as proteínas PERK total, p-PERK, eIF2 α total, p-eIF2 α e ATF4. A figura 15A mostra o resultado da expressão da PERK total, que embora não tenha tido diferença significativa, observou-se redução de 36% no grupo TF-CAF comparado ao grupo SED-CAF. Isso também foi observado na figura 15B com a redução na expressão da p-PERK no grupo TF-CAF em 59% comparado ao grupo SED-CAF. No entanto, a diferença não foi significativa entre os grupos.

Figura 15- Expressão proteica da PERK no fígado (A) (n=7/grupo), expressão proteica da p-PERK no fígado (B) (n=7 e 8/grupo).

A expressão das proteínas eIF2 α total e p-eIF2 α estão representadas nas figuras 16A e 16B, respectivamente. Embora não tenha sido encontradas diferenças significativas, foi observada redução de 15% da eIF2 α total no grupo TF-CAF comparado ao SED-CAF, e aumento na expressão da p-eIF2 α em 28% no grupo TF-CAF comparado ao SED-CAF.

Figura 16- Expressão proteica da eIF2α total no fígado (A) (n=7 e 8/grupo), expressão proteica da p-eIF2α no fígado (B) (n=7 e 8/grupo).

Por fim, a expressão da proteína ATF4 aumentou significativamente em 54% no grupo TF-NO comparado ao grupo TF-CAF. Os demais grupos não apresentaram diferença estatística (Figura 17).

Figura 17- Expressão proteica do ATF4 no fígado (n=8/grupo). *p<0,05 vs. TF-CAF.

5.8 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

Na Tabela 5 estão apresentados os dados de histologia de cada animal por grupo. Conforme pode ser observado, todos os animais mantiveram o NAS entre 0 a 2, o que confirma a ausência de EHNA. Com esses resultados, é visto que nenhum dos grupos estudados apresentou EHNA, embora na análise qualitativa dos cortes histológicos, seja possível observar grande acúmulo de gotículas de lipídeos no grupo SED-CAF, o que foi visualmente reduzido no grupo TF-CAF (Figura 18). Esse dado reforça os achados histológicos prévios do nosso grupo de que o grupo SED-CAF desenvolve DHGNA, e que o TFA previne essa resposta no grupo TF-CAF (LIMA, 2017). Exemplos de cortes histológicos para avaliação do NAS estão representados na Figura 18.

Tabela 5- Análise histológica do fígado por grupo experimental

	Esteatose	Inflamação	Balonização	NAS
SED-NO (n=6)	0	1	1	2
	1	1	0	1
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	1	0	0	1
	1	0	0	1
TF-NO (n=6)	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	1	0	1
	0	0	0	0
	0	0	0	0
SED-CAF (n=5)	0	1	0	1
	0	0	0	0
	1	1	0	2
	1	1	0	2
	1	0	0	1
TF-CAF (n=5)	0	0	1	1
	0	0	0	0
	0	1	0	1
	1	0	0	1
	1	0	0	1

NAS: índice de atividade da EHNA.

A Tabela 6 mostra os dados de deposição lipídica por área de tecido que foram obtidos e posteriormente usados para a classificação do fator esteatose no índice de NAS. Como pode ser observado quando avaliados os valores médios de porcentagem de lipídios por área sem aplicar a classificação, observamos que o grupo TF-NO apresentou menor deposição de lipídios comparado aos demais grupos, e que o grupo TF-CAF apresentou menor deposição de lipídios comparado ao grupo SED-CAF. Esses resultados corroboram os dados prévios do nosso grupo obtido com Oil Red (LIMA, 2017).

Tabela 6 - Deposição de lipídios no tecido hepático (% de lipídio / área).

SED-NO	TF-NO	SED-CAF	TF-CAF
6,4 ± 1,4	0,5 ± 0,2*	10,7 ± 1,9	5,3 ± 1,1 [#]

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

Figura 18- Fotos representativas de cortes histológicos corados com HE no aumento de 40x. Setas indicam: hepatócito com aspecto normal **(A)**, hepatócito com presença de gotículas de lipídeos **(B)**, hepatócito com infiltrado inflamatório **(C)**, hepatócito com balonização **(D)**.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo se propôs a testar a hipótese de que o TFA previne a DHGNA por meio da melhora do EsR associada à redução da lipogênese hepática. Para isso, utilizamos o modelo experimental de dieta de cafeteria, que há anos vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa. Com o uso da dieta de cafeteria, observamos em trabalhos prévios que os camundongos desenvolvem obesidade, resistência à insulina sistêmica, danos no metabolismo do tecido adiposo, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, diminuição nos níveis séricos de adiponectina, maior deposição lipídica nos rins, entre outros (HIGA et al., 2014a; HIGA et al., 2014b;

MULLER et al., 2018; AMERICO et al., 2019). No mais, dados prévios ainda não publicados revelaram aumento significativo na deposição de lipídios no fígado dos animais alimentados com dieta de cafeteria (LIMA, 2017), característico da DHGNA, o que nos estimulou para a continuidade da investigação visando o melhor entendimento dos mecanismos de proteção acionados pelo TFA contra o desenvolvimento da DHGNA.

No presente estudo, confirmamos que o TFA foi eficaz para o aumento da capacidade aeróbia dos animais treinados. Esse dado corrobora os estudos prévios do nosso grupo que utilizaram o mesmo modelo experimental e o mesmo protocolo de TFA (HIGA et al., 2014; MULLER et al., 2018; AMERICO et al., 2019). O aumento na capacidade aeróbia pode ser decorrente do aumento de fibras do tipo I, melhora na capacidade oxidativa do músculo esquelético e retorno venoso, que são fundamentais para saúde cardiovascular e metabólica, uma vez que previnem doenças como hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade e DM2 (ROQUE et al., 2013; VANCAMPFORT; STUBBS, 2017).

Não é novidade que o TFA tem se mostrado uma ferramenta de prevenção amplamente utilizada para o controle de peso corporal, da adiposidade e da obesidade (BIRD et al., 2017; BOUDIA et al., 2017). Nossos resultados mostraram que o TFA foi eficaz para o controle de peso corporal dos animais treinados comparado aos sedentários, independente da dieta. A prevenção da obesidade por meio do TFA também já havia sido mostrada nos nossos estudos prévios em animais alimentados com dieta de cafeteria (HIGA et al., 2014; MULLER et al., 2018; AMERICO et al., 2019), e essa resposta é fundamental para a manutenção da saúde metabólica e cardiovascular. Isso porque é amplamente sabido que o aumento da massa adiposa e do peso corporal estão relacionadas com o desenvolvimento de resistência à insulina, DM2, hipertensão arterial e doença cardiovascular. Além disso, a obesidade pode levar ao acúmulo intracelular de lipídios e a formação de gotículas lipídicas nos hepatócitos, as quais podem ativar macrófagos e promover aumento das citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6 e o TNF- α , desempenhando papel significativo no desenvolvimento da DHGNA (WANG et al., 2017). Essa inflamação está associada à progressão da DHGNA à fibrose, cirrose e doença hepática crônica (RAHMAN et al., 2016).

Quanto à avaliação do peso do fígado, os grupos TF-NO, TF-CAF e SED-CAF apresentaram menor peso do fígado comparado ao SED-NO. Esse dado já havia sido

observado no estudo prévio do nosso grupo (LIMA, 2017), e corrobora o estudo de LEPORE et al., (2015), no qual os animais alimentados com dieta de cafeteria tiveram o peso do fígado reduzido.

No presente estudo, observamos maior consumo alimentar do grupo SED-NO em relação aos outros grupos experimentais, e maior consumo alimentar do grupo TF-NO comparado ao grupo TF-CAF. Interessante que, os resultados anteriores do nosso grupo mostraram que o consumo alimentar entre os grupos não foi diferente HIGA et al. (2014); MÜLLER et al. (2018); AMERICO et al. (2019), o que nos leva a considerar uma possível mudança no padrão de consumo alimentar entre os lotes de animais, uma vez que não foi modificado qualquer método de análise e também o biotério de manutenção dos animais. Um ponto importante a se destacar é que o ganho de peso corporal do grupo SED-NO foi maior do que todos os outros grupos, dado que corrobora o maior consumo médio de ração por esse grupo, tendo em vista que o balanço energético é resultante da quantidade de calorias ingeridas e gastas.

Em relação ao consumo hídrico, observamos que os grupos SED-CAF e TF-CAF consumiram menos água comparado ao grupo SED-NO, o que sinaliza uma possível influência da dieta no consumo de água. Em dados publicados anteriormente pelo nosso grupo, utilizando o mesmo protocolo experimental, foi demonstrado que a ingestão de água foi menor em ambos os grupos alimentados com dieta de cafeteria (SED-CAF e TF-CAF) comparado aos grupos de dieta normocalórica (SED-NO e TF-NO), bem como a produção de urina dos grupos de cafeteria foi menor em comparação aos grupos com dieta normocalórica (MULLER et al., 2018). Como a água é utilizada na preparação da dieta de cafeteria, é possível que isso esteja colaborando para o menor consumo de água durante o protocolo experimental.

Parte dos efeitos do TFA na morfologia e função do fígado de animais alimentados com dieta de cafeteria foi previamente estudado pelo nosso grupo, e um dos principais achados foi a prevenção da deposição de lipídios no fígado e menor conteúdo da proteína pró-inflamatória IL-6 no grupo TF-CAF comparado ao SED-CAF (LIMA, 2017). Esse achado foi corroborado no presente trabalho por meio da análise da deposição de lipídios por área utilizada para aplicar a classificação do índice de NAS, uma vez que o grupo TF-NO apresentou menor deposição de lipídios comparado aos demais grupos, e que o grupo TF-CAF apresentou menor deposição de lipídios comparado ao grupo SED-CAF. Tais resultados revelaram o potencial do TFA para a prevenção da DHGNA. No entanto, de acordo com os resultados obtidos

no Índice de NAS, confirmamos que o modelo experimental de dieta de cafeteria não desenvolve a EHNA. E, tampouco, o TFA exerce qualquer efeito sobre índice de NAS.

O aumento na deposição de lipídios no fígado pode ser decorrente do desbalanço entre a síntese e a oxidação dos ácidos graxos. Por outro lado, a ativação do metabolismo oxidativo e a redução de processos lipogênicos podem contribuir diretamente para a redução do conteúdo de lipídeos hepáticos (SALMINEN et al., 2011; AL-JIFFRI et al., 2013; CHO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014). Buscando entender a contribuição da lipogênese nesse cenário, avaliamos a atividade da citrato sintase, que é uma enzima importante para o reabastecimento do conteúdo citoplasmático de acetil-CoA para a via lipogênica através da produção de citrato, durante períodos de excesso de energia. Os resultados não foram diferentes entre os grupos. Além disso, observamos que a atividade da G6PDH, que é uma enzima envolvida na produção do co-fator NADPH necessário para a ação lipogênica da enzima FAS, aumentou significativamente apenas no grupo TF-NO. No entanto, a expressão protéica da FAS não diferiu entre os grupos. Por fim, a expressão protéica da DGAT2, que é uma enzima chave para a esterificação de ácidos graxos em triglicerídeos, também não foi diferente entre os grupos. O conjunto desses dados sinalizam que tanto a dieta de cafeteria quanto o TFA não modificaram a atividade lipogênica dos grupos estudados, e que, portanto, o desenvolvimento da DHGNA no grupo SED-CAF bem como a prevenção da DHGNA no grupo TF-CAF não está associado com mudanças na atividade lipogênica hepática.

Apesar de os nossos resultados não apontarem o protagonismo da atividade lipogênica na redução da deposição lipídica hepática, um achado recente na literatura de LA FUENTE et al. (2019) revelou que o TFA reduziu os danos hepáticos induzidos por dieta rica em gordura, e que o conteúdo de gotículas de lipídios não modificou, mas o tamanho das gotículas foi diminuído. Foi mostrado também que a lipólise não modificou, no entanto, os níveis de SREBP-1c estavam significativamente reduzidos. Esse resultado condiz com menor atividade lipogênica induzida pelo TFA. Curiosamente, os animais treinados e alimentados com dieta controle apresentaram aumento no número de gotículas de lipídios no fígado, assim como aumento nas proteínas lipogênicas (SREBP-1c e FAS) e lipolíticas (ATGL e HSL). Tais achados revelam que a dinâmica metabólica dos lipídios é complexa, e que deve ser interpretada considerando o modelo e a condição experimental utilizados. No nosso estudo, embora a atividade da enzima G6PDH tenha aumentado no grupo TF-NO, é

possível que isso não tenha refletido em aumento na lipogênese, uma vez que a atividade da FAS não foi diferente estatisticamente no grupo TF-CAF.

Com relação a DGAT2, MONETTI et al. (2007) mostraram que ratos alimentados com dieta rica em gordura por 8 semanas apresentaram expressão elevada de DGAT2 e DHGNA. YU et al. (2005) demonstraram que a redução na expressão do gene da DGAT2 foi associada à melhora da EHNA independente de alteração na sensibilidade à insulina. XU et al. (2015) encontraram níveis elevados de DGAT2 em células do parênquima hepático em camundongos com DHGNA. Por fim, KANTARTZIS et al. (2009) observaram que o polimorfismo no gene da DGAT2 influencia a redução na deposição de lipídios no fígado de indivíduos submetidos a um programa de mudança de estilo de vida com dieta saudável e exercício físico. Como nossos resultados de DGAT2 no fígado não corroboram a literatura, é possível especular que o protocolo experimental utilizado seja um dos responsáveis pelos diferentes achados.

Outro fator importante a ser considerado é como o metabolismo hepático se comporta diante da restrição alimentar, visto que nossos animais ficam 8 horas em jejum antes de serem submetidos ao procedimento de morte. No estado pós-prandial, o excesso de carboidratos no fígado é convertido em triglicerídeos, enquanto no jejum, esse caminho lipogênico é desligado (SHIMANO et al., 1999; YAHAGI et al., 2002). No jejum, a expressão da SREBP-1c é muito reduzida, consequentemente ocorre a diminuição de proteínas alvos ativadas pela SREBP-1c, como a FAS (YOSHINORI et al., 2016). Com isso, é possível afirmar que a expressão da SREBP-1c bem como da FAS, é regulada pelas condições nutricionais. Além disso, estudos na literatura mostraram a expressão da proteína Krüppel-like fator 15 (KLF15), abundante no fígado durante o jejum, e que contribui para regulação da gliconeogênese (TESHIGAWARA et al., 2005; GRAY et al., 2007). O aumento na expressão do KLF15 no fígado de camundongos provoca diminuição na atividade promotora de SREBP-1c e FAS. Por outro lado, quando avaliado camundongos *knockout* de KLF15, observou-se atividade promotora significativamente mais alta de SREBP-1c em 6 horas de jejum (TESHIGAWARA et al., 2016). Esses achados sugerem que a regulação da lipogênese no fígado tem relação direta com o estado nutricional, e pode ter influenciado direta ou indiretamente os nossos resultados de lipogênese hepática.

Considerando que o FGF21 exerce efeito anti-lipogênico e que o TFA poderia reduzir a lipogênese hepática no grupo TF-CAF, imaginamos que o aumento do

FGF21 no grupo TF-CAF poderia ser um dos mecanismos acionados pelo TFA para a prevenção da DHGNA. No entanto, isso não foi observado no nosso estudo haja visto nenhum grupo apresentar diferença na expressão do FGF21. O FGF21 vem sendo estudado como uma proteína promissora para o tratamento da obesidade e DM2, principalmente por agir na regulação da homeostase do metabolismo de lipídios e glicose (FISHER et al., 2016; KHARITONENKOV; DIMARCHI, 2017; SALMINEN et al., 2017). A inalteração do FGF21 hepático, mesmo diante da dieta de cafeteria e do TFA, corrobora os dados de atividade lipogênica.

Um aspecto de suma importância a ser analisado em relação a expressão do FGF21 no fígado é o tempo de sua ação. FISHER et al. (2011) relataram o aumento significativo na expressão de PGC1 α no fígado durante 1 a 4 horas após a injeção de FGF21. Considerando que a ação do FGF21 no fígado possa ser mais rápida e transitória, e que nossos animais são mortos 48 horas após a última sessão de TFA, não podemos descartar que esse cenário tenha afetado a expressão dessa proteína em nossos grupos experimentais.

O aumento na deposição de lipídios pode induzir o EsR, porém para que isso não ocorra, a UPR deve ser acionada. Nesse sentido, considerando que o grupo SED-CAF desenvolve DHGNA, era esperado que as proteínas t-PERK, p-PERK, t-eIF2 α , p-eIF2 α e ATF4 respondessem de maneira elevada nesse grupo em comparação ao SED-NO. No entanto, isso não foi observado, pois é possível que o tempo de ingestão da dieta de cafeteria em nosso protocolo não tenha sido suficiente para apresentar essa resposta, mesmo o grupo SED-CAF tendo desenvolvido DHGNA.

Estudos na literatura confirmaram a redução do EsR pelo TFA (THYFAULT et al., 2009; DA LUZ et al., 2012; PASSOS et al., 2015; BANITALEBI et al., 2019). Nesse sentido, era esperado que o grupo TF-CAF apresentasse redução na expressão das proteínas sinalizadoras de EsR comparado ao grupo SED-CAF. No entanto, o grupo TF-CAF não apresentou modificação nas proteínas marcadores de EsR avaliadas no presente estudo, o que de certo modo é coerente com a não indução do EsR pela dieta de cafeteria. Talvez, se o protocolo de dieta fosse mais longo em semanas ou os componentes da dieta fossem modificados, poderíamos obter respostas mais exuberantes dos marcadores de EsR.

O único efeito observado nos marcadores de EsR foi o aumento na expressão de ATF4 no grupo TF-NO em comparação ao TF-CAF. É sabido que o ATF4 age na indução do metabolismo redox, regulando a apoptose e a autofagia celular, e

protegendo a célula contra o EsR (PASSOS et al., 2015). YU et al. (2014) sugerem que o ATF4 é um regulador positivo na diferenciação de adipócitos, podendo ser uma proteína importante para homeostase energética. Surgiu na literatura, a hipótese de que os adipócitos elevariam a UPR para aliviar o EsR causado pela adipogênese (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2007). Foi visto que a maior expressão de ATF4 está associada com aumento na diferenciação de adipócitos, enquanto que o *knockout* de ATF4 reduz a diferenciação através da regulação do PPAR γ (YU et al., 2014). Diante disso, é possível que o aumento significativo na expressão do ATF4 no grupo TF-NO sem ativação da PERK e da eIF2 α , pode estar mais relacionado ao efeito do TFA no metabolismo de lipídios do que propriamente na ativação da UPR. Contudo mais estudos são necessários para elucidar essa resposta.

7 CONCLUSÃO

O conjunto de resultados do presente estudo permite afirmar que o TFA aumenta a capacidade aeróbia, reduz o peso corporal e previne a DHGNA independente de alterações na atividade lipogênica hepática e na resposta de EsR.

8 REFERÊNCIAS

- AHN, S. B. et al. Expression of Liver X Receptor Correlates with Intrahepatic Inflammation and Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, Seoul, v.129, n.5, p. 2975-82, 2014.
- AL-JIFFRI, O. et al. Weight reduction improves markers of hepatic function and insulin resistance in type-2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver. **African Health Sciences**. King Abdulaziz, v. 13, n. 3, p. 667-672, 2013.
- AMERICO, A. L. V. et al. Aerobic exercise training prevents obesity and insulin resistance independent of the renin angiotensin system modulation in the subcutaneous white adipose tissue. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–22, 2019.
- ANGULO, P. et al. Liver fibrosis, but no other histologic features, associates with long-term outcomes of patients with NAFLD. **Gastroenterology**. Copenhagen, v.149, n.2, p.389–397, 2015
- ANH, R.; MCCAFFREY, J. Plain water consumption in relation to energy intake and diet quality among US adults, 2005–2012. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. Champaign, Oct, v.29, n.5, p. 624-32, 2016.
- ASCHENBACH, J.R. et al. Expression of mRNA for glucose transport proteins in jejunum, liver, kidney and skeletal muscle of pigs. **Journal of Physiology and Biochemistry**. Leipzig, Sep, v.65, n.3, p.251-66, 2009.
- ASHRAF, N.U; SHEIKH, T.A. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radical Research**, Jammu and Kashmir, Aug,v.49, n.12, p.1405-1418,2015.
- BAICEANU, A. et al. Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. **Nature Reviews Endocrinology**. Cluj-Napoca, Dec, v.12, n.12, p.710-722, 2016.
- BEDOSSA, P. Histological Assessment of NAFLD. **Digestive Diseases Sciences**. Paris, May, v.61, n.5, p.1348–55, 2016.
- BELEW, G. D. et al. Transfer of Glucose Hydrogens via Acetyl-CoA, Malonyl-CoA and NADPH to Fatty Acids during de novo Lipogenesis. **Journal of lipid research**. Cantanhede, v.60, n.10, 2019.
- BERNARDIS, L. L; PATTERSON, B. D. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, New York, v.40, p.527-528, 1968.
- BIRD, S. R.; HAWLEY, J. A. Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. **BMJ Open Sport & Exercise Medicine**. Liverpool. Mar, v.1;2, n.1, 2017.

BOUDIA, D. et al. Beneficial effects of exercise training in heart failure are lost in male diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**. Paris, v. 123, n.6 p. 1579-1591, 2017.

BRADLEY, R.L.; JEON, J.Y.; LIU, F.F.; MARATOS-FLIER, E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**. Boston, Sep, v.295, n.3, p.586-94, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. BRASIL. Ministério da Saúde, 2018.

BRIL F, CUSI K. Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes: A Call to Action. **Diabetes Care**. Gainesville, Mar, v.40, n.3,p.419-430, 2017.

CAO, J. et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ ATF4/CHOP signaling pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**. Chongqin, May, v.64, n.1-2, p.115-29, 2012.

CAPALDO, B. et al. Splanchnic and leg substrate exchange after ingestion of a natural mixed meal in humans. **Diabetes**. Naples, v.48, n.5, p.958–966, 1999.

CHO, J. et al. Effect of aerobic exercise training on non-alcoholic fatty liver disease induced by a high fat diet in C57BL/6 mice. **The Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**. Suwon, v.18, n.4, p.339-46, 2014.

CINTRA, D.E. et al. Reversion of hepatic steatosis by exercise training in obese mice: the role of sterol regulatory element-binding protein-1c. **Life Sciences**. Criciúma, May v.1, n.152,p.178-179, 2012.

COSKUN, T. et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. **Endocrinology** Indianapolis, Dec, v.149, n.12, p.6018- 27, 2008.

CRANDALL, J. P. et al. The prevention of type 2 diabetes. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, New York, Jul, v.4. n.7, p.382-93, 2008.

CUEVAS-RAMOS, D. et al. Exercise increases serum fibroblast growth factor 21 (FGF21) levels. **PLoS ONE**. United Kingdom. v.7, n.5, 2012.

CULLINAN, S.B.; DIEHL, J.A. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. **Journal of Biological Chemistry**, Philadelphia, May v.7, n.19, p. 20108-17, 2004.

CZECH, M.P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **Journal of Biological Chemistry**. Massachusetts, Jan v.22, n.4, p.1865-8,1999.

DA LUZ, G. et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **European Journal of Applied Physiology**. Criciúma, Sep, v.111, n.9, p.2015-23, 2011.

DEFRONZO, R. et al. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**. Jerusalem, v.58; p. 773–795, 2015.

DELEPINE, M, M. et al. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2- α kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. **Nature Genetics**. Evr,. Aug, v.25 n.4, p.406-9, 2000.

DE OLIVEIRA D. S, et al. Exercise training attenuates insulin resistance and improves β -cell function in patients with systemic autoimmune myopathies: a pilot study. **Clinical Rheumatology**. Sao Paulo, Aug v.10, 2019.

DONNELLY, K.L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Investigation**. Minnesota. May, v.115, n.5, p.1343-51, 2005.

DUSHAY, J. et al. Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**. Massachusetts. Aug,v.139, n.2, p.456-63, 2010.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. São Paulo, v. 34, n. 8, p. 760-765, 2007.

FISHER, F.M. et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)- resistant state. **Diabetes**. Massachusetts. Nov, v.59, n.11, p.2781-9, 2010.

FOLTZ, I.N. et al. Treating diabetes and obesity with an FGF21-mimetic antibody activating the bKlotho/FGFR1c receptor complex. **Science Translational Medicine**. Columbia. Nov, v.28, n.4, p.162-162, 2012.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. São Paulo. v.50. n.2 p.216-229, 2006.

FRAULOB, J.C. et al. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. Rio de Janeiro. May, v.46, n.3, p.212-23, 2010.

FROSIG, C.et al. Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle: interactions at the level of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and AS160. **Diabetes**. Copenhagen. Aug, v.56, n.8, p.2093-102, 2007.

GASTALDELLI, A.; COGGAN, A.R.; WOLFE, R.R. Assessment of methods for improving tracer estimation of non-steady-state rate of appearance. **Journal of Applied Physiology**. Galveston. v.87, n.5, p.1813–1822,1999.

GASTALDELLI, A.; GAGGINI.; DEFRONZO, R. Glucose kinetics: an update and novel insights into its regulation by glucagon and GLP-1. **Current Opinion Clinical Nutrition and Metabolic Care**. San Antonio. Jul, v.20, n.4, p.300-309, 2017.

GHAMARCHEHREH, M. E; SHAMSODDINI, A; ALAVIAN, S. M. Investigating the impact of eight weeks of aerobic and resistance training on blood lipid profile in elderly with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial. **Journal of Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**. Tehran. Summer, v.2, n.3, p. 190-196, 2019.

GHAREGHANI, P. et al. Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice. **Obesity Research & Clinical Practice**. Tehran. Feb, v.12, n.2, p.80-89, 2017.

GOLLISCH, K. S. C.; *et al.* Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**. Massachusetts. Aug, v.297, n.2, p.495-504, 2009.

GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Thematic review series: adipocyte biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. **Journal of Lipid Reseach**. Boston. Sep, v.48, n.9, p.1905-14, 2007.

GRAY, S. et al. The Kruppel-like Factor KLF15 Regulates the Insulin-sensitive Glucose Transporter GLUT4. **Journal of Biological Chemistry**. Chicago. v.277:p.34322–34328, 2002.

GRAY, S. et al. Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15. **Cell Metabolism**. v.5, p.305–312, 2007.

GUO, X., et al. Rutin and Its Combination With Inulin Attenuate Gut Dysbiosis, the Inflammatory Status and Endoplasmic Reticulum Stress in Paneth Cells of Obese Mice Induced by High-Fat Diet. **Frontiers in microbiology**. Chengdu. Nov. 5;9:2651, 2018.

HARDING, H. P. et al. Perk is essential for translation regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Molecular Cell**. New York. May, v.5, n.5, p.897-904, 2000.

HARDING, H. P. et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Molecular Cell**. New York. Nov, v.6, n.5, p. 1099-108, 2000.

HELLERSTEIN, M.K. De novo lipogenesis in humans: Metabolic and regulatory aspects. **European Journal of Clinical Nutrition**. v.53, p.53–65, 1999.

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

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

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**. Massachusetts. Dec 14;444(7121):p. 860-7, 2006.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. **International of Journal Obesity**. Boston. Dec, v.32, n.7, p.52-4,2008

HUANG, K.H. et al. Lipid Emulsion Added to a Liquid High-Carbohydrate Diet and Voluntary Running Exercise Reduce Lipogenesis and Ameliorate Early-Stage Hepatic Steatosis in Mice. **The Journal of Nutrition**. Pennsylvania. May, v.147, n.5, p. 746-753, 2017.

JEANES, Y.; REEVES, S. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: Diagnostic and methodological challenges. **Nutrition Research Reviews**. London. Jun, v.30, n.1, p. 97-105, 2017.

JIANG, H. Y. et al. Phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF- κ B in response to diverse cellular stresses. **Molecular and Cellular Biology**. Indianapolis. Aug, v.23, n.16, p. 5651-63., 2003.

JIANG, S. et al. Fibroblast growth factor 21 is regulated by the IRE1a–XBP1 branch of the unfolded protein response and counteracts endoplasmic reticulum stress-induced hepatic steatosis. **Journal of Biological Chemistry**. Shanghai. Oct v.24, n.43, p.29751-65, 2014.

JIMENEZ, V. et al. FGF21 gene therapy as treatment for obesity and insulin resistance. **EMBO Molecular Medicine**. Barcelona, v.10, n. 8, p.8791, 2018.

KANT, A.K.; GRAUBARD, B.I.; ATCHISON, E.A. Intakes of plain water, moisture in foods and beverages, and total water in the adult US population – nutritional, meal pattern, and body weight correlates: National Health and Nutrition Examination Surveys 1999–2006. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Flushing. Sep, v. 90, n.3, p. 655-63, 2009.

KAUFMAN, R. J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes & Development**. Michigan. May, v. 15, n.10, p.1211-33., 1999.

KAWAGUCHI, T. et al. Hybrid training of voluntary and electrical muscle contractions reduces steatosis, insulin resistance, and IL-6 levels in patients with NAFLD: a pilot study. **Journal of Gastroenterology**. Kurume, Jun, v.46, n.6, p.746-57, 2011.

KEIHANIAN, A; ARAZI, H; KARGARFARD, M. Effects of aerobic versus resistance training on serum fetuin-A, fetuin-B, and fibroblast growth factor-21 levels in male diabetic patients. **Physiology International**. Isfahan. Mar, v.1;106, n.1, p. 70-80, 2019.

KIM, K.H. et al. Acute exercise induces FGF21 expression in mice and in healthy humans. **PLOS ONE**. Seoul. May, v.7;8, n.5, p.635-17, 2013.

KIM, J. S. et al. Effect of exercise training of different intensities on anti-inflammatory reaction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biology of Sport**. Jeonbuk. Ma, v.31, n.1, p. 73–79, 2014.

KIM, K.H.; LEE, M.S. FGF21 as a mediator of adaptive responses to stress and metabolic benefits of anti-diabetic drugs. **Journal of Endocrinology**. Seoul. Jul, v.226, n.1, p.1-16, 2015.

KIM, S.O. et al. Illudins C2 and C3 stimulate lipolysis in 3T3-L1 adipocytes and suppress adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Journal of Natural Products**. Daejeon. Mar, v.77, p. 744–750, 2014

KLOVER, P.J.; MOONEY R.A. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. New York. May, v.36, n.5, p. 753-8, 2004.

KOVESDY, C.P.; FURTH, S.; ZOCCALI, C. Obesity and kidney disease: Hidden consequences of the epidemic. **African Journal of Primary Health Care & Family Medicine**. São Paulo. v.39 n. 1, p.1-14, 2017.

KRISTENSEN, C. M. et al. PGC-1 α in hepatic UPR during high-fat high-fructose diet and exercise training in mice. **Physiological reports**. Copenhagen, Aug, v.6,n.15, p.138-19, 2018.

KUCERA, O.; CERVINKOVA, Z.; Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. **World Journal of Gastroenterology**. Hradec Kralove. Jul, v.1, 20, n.26, p.8364–8376, 2014.

LA FUENTE, L; QUEZADA, C; SEPÚLVEDA, et al. Exercise regulates lipid droplet dynamics in Normal and fatty liver, BBA - **Molecular and Cell Biology of Lipids**. Santiago, v.1864, n.12, p. 1585-19, 2019.

LEE, G. End-stage renal disease in the Asian-Pacific region. **Seminars Nephrology**. Singapore Jan. v.23, n.1, p. 107-14, 2003.

LEE, J.; OZCAN, U. Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. **Journal of Biological Chemistry**. Massachusetts, v.289, p.1203–11, 2014.

LEE S.M. et al. Kcne2 deletion impairs insulin secretion and causes type 2 diabetes mellitus. **The FASEB Journal**. Irvine. Jun, v.31, n.6, p. 2674-2685, 2017.

LEPORE, S. M. et al. Oral administration of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivative prevents hepatic steatosis, hyperinsulinemia, and weight gain in mice fed with high fat cafeteria diet. **International Journal of Endocrinology**. Udine, v. 9, p. 431-453, 2015.

LI, B., et al. Schisantherin A alleviated alcohol-induced liver injury by the regulation of alcohol metabolism and NF-kB pathway. **Experimental animals**. Shenyang, v.67, n.4, p. 451–461, 2018.

LI, H; ZHANG, J; JIA, W. Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology. **Frontiers in Medicine**. Shanghai. Mar, v.7, n.1, p.25-30, 2013.

LI H., et al. Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. **Journal of Hepatology**. Shanghai, Nov, v.53, n.5, p. 934-40, 2010.

LIANG, W. et al. Establishment of a General NAFLD Scoring System for Rodent Models and Comparison to Human Liver Pathology. **PLoS ONE**. Leiden. Dec, v.23, n. n.12, p.1159-22, 2014.

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

LOYD, C. et al. Fibroblast growth factor 21 is required for beneficial effects of exercise during chronic high-fat feeding. **Journal of Applied Physiology**. Birmingham. Sep, v.1;121, n.3, p. 687-98, 2016.

MA, C. et al. Pronuciferine and nuciferine inhibit lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes by activating the AMPK signaling pathway. **Life Science**. Yantai. Sep, v.1, n.136, p. 120-5, 2015.

MAGRÌ, S. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with inflammatory bowel disease: Beyond the natural history. **World J Gastroenterol**. Monserrato. Oct v.7,n.37, p.5676-5686, 2019.

MALONE, J; HANSEN, B. Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? **Pediatric Diabetes**. Florida. Feb, v.20, n.1, p. 5-9, 2019.

MIELE, L.; TARGHER, G. Understanding the association between developing a fatty liver and subsequent cardio-metabolic complications. **Expert Review of Gastroenterol & Hepatololy**. Rome. v.9, n.10, p.1243–1245, 2015.

MITHIEUX, G. Brain, liver, intestine: a triumvirate to coordinate insulin sensitivity of endogenous glucose production. **Diabetes & Metabolism**. Lyon. Oct, v.36,n.3, p.50-3, 2010.

MONETTI, M. et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. **Cell Metabolism**. San Francisco. Jul, v.6, n.1, p. 69-78, 2007.

MOORE, M.C. et al. Disposition of a mixed meal by the conscious dog. **American Journal of Physiology**. Nashville. Apr, v.266, n.4, p.666–675, 1994.

MOORE, P. C; OAKES, S. A. CPEB4 links the clock and the UPR to protect the liver. **Nature cell biology**. San Francisco. Jan,v.31;19,n.2, p.79-81, 2017.

MUECKLER, M.; THORENS, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. **Molecular Aspects of Medicine**. St. Louis. Apr-Jun v.34, n.2-3, p.121-38, 2013.

MULLER, C.R. et al. Aerobic exercise training prevents kidney lipid deposition in mice fed a cafeteria diet. **Life Sciences**. Sao Paulo. Oct v.15;2, n.11, p.140-146, 2018.

NATALI, A. et al. Effects of acute alpha 2-blockade on insulin action and secretion in humans. **American Journal of Physiology**. Pisa .Jan, v.274n.1, p. 57-64, 1998.

NGUYEN, P. Liver lipid metabolism. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. Lie`ge. v. 92, n.3, p. 272 -83, 2008.

OAKES. A. S; PAPA, F.R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. **Annual Review of Pathology**. San Francisco. Oct. v.10, p.173–194, 2015

OLIVA, J. et al. Proteasome inhibitor treatment reduced fatty acid, triacylglycerol and cholesterol synthesis. **Experimental and Molecular Pathology**. Torrance. Aug, v.93, n.1, p. 26-34, 2012.

OLIVEIRA, A.G. et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. **Diabetes**. Campinas. Mar, v.60, n.3, p. 784-96, 2011.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS (World Health Organization – WHO). **Obesity and Overweight**. United Nations. Estados Unidos da América, 2012.

OYADOMARI, S. et al. Dephosphorylation of translation initiation factor 2alpha enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. **Cell Metabolism**. New York. Jun, v.7, n.6, p.520-32, 2008.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**. Boston. Oct, v.15;306, n.5695, p. 457-61, 2004.

OZCAN, U. et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**. Boston. Aug v.25, n. 313, p. 1137-40, 2006.

PAGLIASSOTTI, M.J. Endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease . **Annual Review of Nutrition** . Fort Collins. Aug v.21, n.32, p. 17-33, 2012.

PAN, H.; GUO, J.; SU, Z. Advances in understanding the interrelations between leptin

resistance and obesity. **Physiology & Behavior**. Guangdong. May, v.10, n.130, p.157-69, 2014.

PASSOS, E. et al. Role of physical exercise on hepatic insulin, glucocorticoid and inflammatory signaling pathways in an animal model of non-alcoholic steatohepatitis. **Life Science**. Porto. v.123, p.51–60, 2015.

PAULI, J.R. et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in dietinduced obese Wistar rats. **The Journal of Physiology**. Campinas. Jan, v.15;586, n.2, p. 659-71, 2008.

PERRY, R.J. et al. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**. Connecticut. Jun, v.5;510, n.7503, p. 84-91, 2014.

PESSIN, J.E.; SALTIEL, A.R. Signaling pathways in insuli action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**. Iowa. Jul, v.106, n.2, p.165-9, 2000.

POHL, R. et al. Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis. **Europaena of Journal Clinicala Investigation**. Regensburg. Jan, v.47,n.1, p.7-18, 2017.

PRELL T.; LAUTENSCHLAGER J.; GROSSKREUTZ J. Calcium-dependent protein folding in amyotrophic lateral sclerosis. **Cell Calcium**. Jena. Aug, v.54, n.2, p.132-43, 2013.

PÜSCHEL, G. P; HENKEL, J. Dietary cholesterol does not break your heart but kills your liver. **Porto biomedical journal**. Nuthetal. Aug, v.3, n.1, p.12, 2019.

RAHMAN, K. et al. A loss of junctional adhesion molecule a promotes severe steatohepatitis in mice on a diet high in saturated fat, fructose, and cholesterol. **Gastroenterology**. Atlanta, v. 16, p. 34679-0, 2016.

RECTOR, R.S et al. Mitochondrial Dysfunction Precedes Insulin Resistance and Hepatic Steatosis and Contributes to the Natural History of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in an Obese Rodent Model. **Journal of Hepatology**. Columbia. May, v.52, n.5, p. 727-36, 2010.

ROPELLE, E.R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with single bout of exercise in the rat the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **The Journal of Physiology**. Campinas. Dec, v.15;577,n.3, p.997-1007, 2007.

SALMINEN, A.; KAUPPINEN, A.; KAARNIRANTA, K. FGF21 activates AMPK signaling: impact on metabolic regulation and the aging process. **Journal of Molecular Medicine**. Kuopio. Feb, v.95, n.2, p.123-131, 2017.

SAPONARO, C. et al. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. **Nutrients**. Pisa. Nov, v.13;7, n.11, p.9453-74, 2015.

SATTAR, N.; GILL, J.M.R. Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? **BMC Medicine**. Glasgow.v.12: p.123, 2014.

SCHEUNER, D. et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. **Molecular Cell**. Ann Arbor. Jun, v.7,n.6, p.1165-76, 2001.

SCHULTZ, A. et al. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. **Experimental and Toxicologic Pathology**. Rio de Janeiro, v.4, n. 64, p. 273-282, 2012.

SEO, J. et al. Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. **Diabetes**. Dallas. Nov,v.58, n.11, p.2565-73, 2009.

SEYER, P. et al. Hepatic glucose sensing is required to preserve beta cell glucose competence. **The Journal of Clinical Investigation**. Apr,v.123, n.4, p.1662-76, 2013.

SHEN, Y. et al. Additive relationship between serum fibroblast growth factor 21 level and coronary artery disease, Cardiovasc. **Diabetol**. Shanghai. Aug v.28, n.12, p.124, 2013.

SHIMANO, H. et al. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. **Journal of Biological Chemistry**. Tokyo. Dec, v.10;274, n.50, p.35832-9, 1999.

SHORE, G.C.; PAPA, F.R.; OAKES, S.A. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. **Current Opinion in Cell Biology**. Quebec. Apr, v.23, n.2, p.143-9, 2011.

SO, W.Y. et al. High glucose represses b-klotho expression and impairs fibroblast growth factor 21 action in mouse pancreatic islets: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor γ signaling. **Diabetes**. Hong Kong. Nov v.62, n.1, p.3751-9, 2013.

SONG, M. et al. Beneficial effect of dietary Ephedra sinica on obesity and glucose intolerance in high-fat diet-fed mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**. Korea, v. 4, n. 3, p. 707-712, 2012.

SRIWIJITKAMOL, A. et al. Reduced skeletal muscle inhibitor of kappaB beta content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training. **Diabetes**. San Antonio. Mar, v.55, n.3, p.760-7, 2006.

SZEGEZDI, E.; FITZGERALD, U.; SAMALI, A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. **Annals of the New York Academy of Science**. Galway, v.1010, p.186–194, 2003.

SZTALRYD, C.; XU, G.; DORWARD, H, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. **The Journal of Cell Biology**. Bethesda. Jun, v.23;161,n.6, p.1093-103, 2003.

TARGHER, G.; BYRNE C.D. Non-alcoholic liver disease: an emerging driving force in chronic kidney disease. **Nature Review. Nephrology**. Southampton. May, v.13, n.5, p.297-310, 2017.

TESHIGAWARA, K. et al. Role of Kruppel-like factor 15 in PEPCK gene expression in the liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Kobe. Feb, v.18;327, n.3, p.920-6, 2005.

THYFAULT, J.P. et al. Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. **The Journal of Physiology**. Columbia. Apr, v.15;587, n.8, p.1805-16, 2009.

TREFTS, E; GANNON, M; WASSERMAN, D. H. The liver. **Current biology**. Lund. p. v.27, n.21, 2017.

VAN, D.E.R. et al. A 12-week aerobic exercise program reduces hepatic fat accumulation and insulin resistance in obese, Hispanic adolescents. **Obesity**. Houston. Feb, v.18, n.2, p.384-90, 2010.

VIEGAS, I. et al. Effects of dietary carbohydrate on hepatic de novo lipogenesis in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Journal of Lipid Research**. Barcelona. Jul, v.57, n.7, p.1264–1272, 2016.

XU, J. et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. **Diabetes**. California. Jan, v.58,n.1, p.250-9, 2009.

XU, H. et al. Lipid deposition in liver cells: The influence of short form augments of liver regeneration. **Clinical and Research in Hepatology and Gastroenterology**. Beijing. Apr, v.40, n.2, p.186-94, 2015.

XU, X., et al. Preemptive activation of the integrated stress response protects mice from diet-induced obesity and insulin resistance by fibroblast growth factor 21 induction, **Hepatology**. New York. Dec, v.68, n.6, p.2167-2181, 2018.

WANG, Y. et al. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. **Nature**. La Jolla. Jul, v.23;460,n.7254, p.534-7, 2009.

WANG. C. et al. ATF4 regulates lipid metabolism and thermogenesis. **Cell Research**. Shanghai. Feb,v.20,n.2, p.174-84, 2010.

WANG, C. et al. Impact of high-fat diet on liver genes expression profiles in mice model of nonalcoholic fatty liver disease. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. Harbin. v.45, n.19, p. 52-62, 2016.

WANG, L.et al. Comprehensive study of multiple stages progressing to nonalcoholic steatohepatitis with subsequent fibrosis in SD rats. **Internation Journal of Molecular Sciences**. Nanjing. Aug,v.18, n.8, p.1681, 2017.

WEISZENSTEIN, M. Adipogenesis, lipogenesis and lipolysis is stimulated by mild but not severe hypoxia in 3T3-L1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Prague Sep, v.16;478, n.2, p.727-32, 2016.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. Edinburgh. May, v.27, n.5, p.1047-53, 2004.

WU, A.L. et al. Amelioration of type 2 diabetes by antibody-mediated activation of fibroblast growth factor receptor 1. **Science Translational Medicine**. South San Francisco. Dec, v.14;3, n.113, p.113ra126, 2011.

WYATT, S. et al. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. **The American Journal of the Medical Sciences** Mississippi. Apr, v. 331, n.4, p. 166 – 174.

YAHAGI, N. et al. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep (ob)/Lep (ob) mice. **The Journal of Biology Chemistry**. Tokyo. May, v.31;277, n.22, p.19353-7, 2002.

YASARI, S. et al. Effects of Exercise Training on Molecular Markers of Lipogenesis and Lipid Partitioning in Fructose –Induced Liver Fat Accumulation. **Journal of Nutrition and Metabolism**. Montreal, v.10, p. 1155, 2012.

YOSHIDA, H. et al. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell**. Kyoto. Dec v.28;107, n.7, p.881-91, 2001.

YOSHINORI, T. et al. KLF15 enables rapid switching between lipogenesis and gluconeogenesis during fasting. **Cell Reports**. Cleveland. Aug, v.30;16, n.9, p.2373-86, 2016.

YU, X. X. et al. Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. **Hepatology**. Carlsbad. Aug v.42, n.2, p.362-71, 2005.

ZHANG, X. et al. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**. Madison. Oct v.3;135,n.1, p.61-73, 2008.

ZHANG, J. et al. ER stress-induced inflammasome activation contributes to hepatic inflammation and steatosis. **Journal of Clinical Cellular Immunology**. Detroit. Oct, v.7, n.5, p.457 2016.

ZHU, W. et al. Endoplasmic reticulum stress may be involved in insulin resistance and lipid metabolism disorders of the white adipose tissues induced by high-fat diet containing industrial trans-fatty acids. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therap**. Liaoning. v.12: p. 1625–1638, 2019.

ZIERATH, J.R. Invited review: exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**. Stockholm. Aug, v.93, n.2, p.773-81, 2002.