

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A EXPRESSÃO HEPÁTICA DE
ACTIVINA A E FOLISTATINA EM MODELO DE DOENÇA HEPÁTICA
GORDUROSA NÃO ACOÓLICA EM RATOS**

Rafaella Nascimento e Silva

São Carlos – SP

Março – 2012

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A EXPRESSÃO HEPÁTICA DE
ACTIVINA A E FOLISTATINA EM MODELO DE DOENÇA HEPÁTICA
GORDUROSA NÃO ACOÓLICA EM RATOS**

Rafaella Nascimento e Silva

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Fisioterapia do Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal de São Carlos
para a obtenção do título de Mestre
em Fisioterapia.

Orientadora: Ângela Merice de Oliveira Leal

Co-orientadora: Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

São Carlos –SP

Março – 2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586ee

Silva, Rafaella Nascimento e.

Efeitos do exercício físico sobre a expressão hepática de activina A e folistatina em modelo de doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos / Rafaella Nascimento e Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
55 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

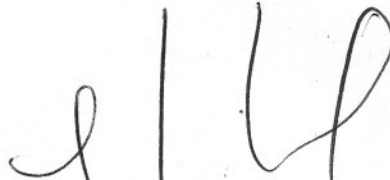
1. Obesidade. 2. Activina. 3. Folistatina. 4. Fígado - doenças. 5. Exercício físico. I. Título.

CDD: 616.398 (20ª)

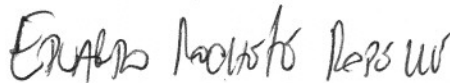
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da banca examinadora para defesa de dissertação de mestrado de RAFAELLA NASCIMENTO E SILVA, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 10 de abril de 2012

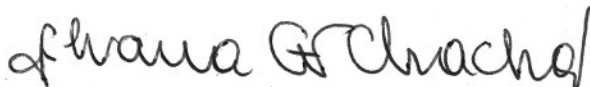
Banca Examinadora:



**Prof.ª Dr.ª Angela Merice de Oliveira Leal
(UFSCar)**



**Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle
(UNICAMP)**



**Prof.ª Dr.ª Silvana Gama Florencio Chachá
(UFSCar)**

DEDICATÓRIA

“Dedico esse trabalho primeiramente à Deus por ter me dado força e discernimento para a realização deste trabalho e aos meus queridos pais, Haroldo e Eva, e meu irmão Raphael, por acreditarem em mim investindo neste sonho e pelos primeiros ensinamentos na vida.”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal, pela sua orientação, por confiar no meu trabalho e por fazer parte da minha formação.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, pela colaboração com seus ensinamentos e por disponibilizar o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular para a realização dos experimentos deste trabalho.

À Profa. Dra. Lucimar Retto da Silva de Avó, pelo apoio e orientação em relação ao estudo da histologia do fígado.

À Ms. Patrícia de Godoy Bueno, pela amizade, pela paciência e pela orientação em relação as análises feitas no PCR-RT.

Aos meus pais, Haroldo Gracio e Eva Creuza, e ao meu irmão, Raphael Augusto, que mesmo distantes estão sempre presentes me apoiando e me incentivando. Amo vocês!

Ao meu namorado, Rodney Henrique, por está sempre me apoiando em todos os momentos me dando força para concluir este trabalho e por me fazer sentir capaz de realizar meus sonhos.

À Josiane Duarte e Daniela Bassi, pela grande amizade, pois foram pessoas que estavam sempre comigo nos momentos alegres e também tristes.

Aos meus amigos e familiares da Paraíba, pela amizade verdadeira, que mesmo a distância é forte, e sinto como se vocês estivessem sempre comigo.

À todo o pessoal do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular-UFSCar, pela amizade e paciência em tirar minhas dúvidas sempre que solicitadas.

Resumo

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado e está associada à obesidade e à resistência insulínica. A activina A, membro da superfamília do fator de crescimento e transformação β (TGF- β), inibe o crescimento de hepatócitos e induz a apoptose. A folistatina é uma glicoproteína que antagoniza as ações biológicas da activina. O exercício é uma importante ferramenta terapêutica na diminuição dos efeitos metabólicos da obesidade. **Objetivo:** Neste estudo, foi avaliado o padrão de expressão de activina A e folistatina no fígado de ratos obesos submetidos ao exercício de natação. **Métodos:** Ratos *Wistar*, machos e adultos tiveram acesso livre à dieta padrão (grupo controle, C) ou dieta hiperlipídica (58% Kcal de gordura, grupo dieta hiperlipídica, DH) durante 12 semanas. O teste de tolerância à glicose (TTG) e o teste de tolerância à insulina (TTI) foram realizados antes e após 3, 4, 8 e 12 semanas. Após 12 semanas, os animais C e DH foram distribuídos aleatoriamente em grupos exercício (CE e DHE) ou grupos sedentários (CS e DHS). Os grupos CE e DHE nadaram por 45 minutos às 9:00h e 17:00h, 5 vezes por semana, durante 4 semanas. Após este período, os animais foram submetidos novamente ao TTG e foram sacrificados por decapitação. O plasma foi coletado para analisar as enzimas hepáticas alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e gama glutamil transferase (GGT). O fígado foi dissecado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior análise. O RNAm da subunidade βA de activina e folistatina foi quantificado por PCR-RT em tempo real. **Resultados:** O grupo DH desenvolveu resistência à insulina de acordo com os testes TTG e TTI. Os níveis de ALT foram significativamente maiores no grupo DHS comparados com o grupo CS e significativamente menores no grupo DHE comparados com o grupo DHS. Os níveis de AST e GGT não variaram entre os grupos. A expressão da subunidade βA de activina foi significativamente maior no grupo DHE comparada com o grupo DHS. A expressão de folistatina foi significativamente menor nos grupos CE e DHE comparado aos grupos CS e DHS, respectivamente. Não houve evidências de esteatose ou inflamação (grau 0) no grupo C. Porém, no grupo DH a severidade da esteatose variou do grau 1 ao grau 3, mas não foi associada com inflamação ou fibrose. Após o período de treinamento, o grupo DHE apresentou melhora na extensão da lesão do parênquima hepático, com severidade da esteatose variando do grau 0 ao grau 1. **Conclusão:** Estes dados sugerem que o exercício reduziu os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica no fígado e a expressão local de activina-folistatina pode está envolvida.

Palavras-chave: doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), activina-folistatina, exercício.

Abstract

Nonalcoholic Fatty Liver disease (NAFLD) is characterized by fat accumulation in the liver and associated with obesity and insulin resistance. Activin A is a member of the transforming growth factor (TGF)- β superfamily which inhibits hepatocyte growth and induces apoptosis. Follistatin is a glycoprotein which antagonizes the biological actions of activin. Exercise is an important therapeutic strategy to decrease the metabolic effects of obesity. **Aims:** In this study, we evaluated the pattern of Activin A and follistatin liver expression in obese rats submitted to swimming exercise. **Methods:** Adult male Wistar rats were allowed free access to standard rodent chow (control group, C) or HF diet (58% Kcal from fat, high-fat group, HF) during 12 weeks. Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed at 12 weeks. After 12 weeks, C and HF rats were randomly assigned to a swimming training group (C-Ex and HF-Ex) or a sedentary group (C-Sed and HF-Sed). C-Ex and HF-Ex swam for 45 minutes at 0900h and 1700h, 5 day week⁻¹, for 4 weeks. After this period, rats were submitted again to GTT and then killed by decapitation. Plasma was collected for liver enzymes, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and gamma-glutamyl transaminase (GGT) determination. Liver was dissected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70⁰ C for subsequent analysis. Activin β A subunit and follistatin mRNA was quantified by real time RT-PCR. **Results:** HF developed insulin resistance according to GTT and ITT tests. ALT levels were significantly higher in HF-Sed than in C-Sed and significantly lower in HF-Ex than in HF-Sed. AST and GGT did not vary among the groups. Activin β A subunit mRNA was significantly higher in HF-Ex than in HF-Sed. Follistatin mRNA was significantly lower in C-Ex and HF-Ex compared to C-Sed and HF-Sed, respectively. There was no evidence of steatosis or inflammation (grade 0) in C. In contrast, in HF the severity of steatosis varied from grade 1 to grade 3. This was not associated with inflammation or fibrosis. After the training period, HF-Ex showed improvement in the extent of liver parenchyma damage, the severity of steatosis varying from grade 0 to grade 1. **Conclusions:** These data suggest that exercise may reduce the deleterious effects of high-fat diet on liver and the local expression of activin-follistatin may be involved.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), activin-follistatin, exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplo de um gel de agarose.....	18
Figura 2	Exemplo de regressão linear da Curva Padrão do gene GAPDH no fígado.....	20
Figura 3	Exemplo de Curva de MELT Original Representativa dos ciclos do PCR-RT.....	21
Figura 4	Exemplo de Curva de Amplificação Original Representativa dos ciclos do PCR-RT.....	22
Figura 5	Massa corporal (g) de animais controle e alimentados por dieta hiperlipídica.....	25
Figura 6	(A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da décima segunda semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e (B) Área sob a curva do TTG.....	26
Figura 7	(A) Teste de Tolerância à Insulina (TTI) ao final da décima segunda semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e (B) Área sob a curva do TTI.....	28
Figura 8	(A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) Pré- e Pós-exercício e (B) Área sob a curva do TTG pré- e pós-exercício.....	30
Figura 9	Dosagem da enzima hepática Alanina Transaminase (ALT) do plasma de ratos.....	31

Figura 10	Dosagem da enzima hepática Aspartato Transaminase (AST) do plasma de ratos.....	32
Figura 11	Dosagem da enzima hepática Gama-glutamil Transferase (GGT) do plasma de ratos.....	32
Figura 12	Dosagem de colesterol (mg/dl) do plasma de ratos.....	33
Figura 13	Dosagem de Triglicérides (mg/dl) do plasma de ratos.....	33
Figura 14	Expressão de RNAm de Activina β A e Folistatina no fígado de ratos.....	34
Figura 15	Análise histológica do fígado de ratos alimentados por dieta padrão e dieta hiperlipídica.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Sistema de escore de atividade histológica da DHGNA.....	16
Tabela II	Sequência de <i>Primers</i>	20
Tabela III	Análise do grau de esteatose hepática.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: micrograma

µL: microlitro

AG: Ácidos Graxos

ALKs: Activin Receptor-Like kinase

ALT: Alanina Transaminase

AST: Aspartato Transaminase

BMPs: Proteínas Ósseas Morfogenéticas

DHGNA: Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

EHNA: Esteatohepatite Não Alcoólica

FSH: Hormônio Folículo-Estimulante

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GDFs: Fatores de Diferenciação e Crescimento

GGT: Gama Glutamil-Transferase

HE: Hematoxilina-Eosina

IRS: Substrato do Receptor de Insulina

JAK-2: Janus-quinase 2

MDA: Malondialdeído

NF-κB: fator de transcrição regulador da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão

PI-3 quinase: Fosfatidilinositol-3-quinase

RI: Receptor de Insulina

RNA_m: Ácido Ribonucléico Mensageiro

Shc: Proteína semelhante ao colágeno com homologia Src

TGF- β : Superfamília do Fator β de Transformação e Crescimento

VLDL: Lipoproteína de Densidade muito baixa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Animais e Condições Experimentais.....	12
3.2 Controle de Ingestão Alimentar e Massa Corporal.....	13
3.3 Controle Glicêmico.....	13
3.3.1 Teste de Tolerância à Glicose (TTG).....	13
3.3.2 Teste de Tolerância à Insulina (TTI).....	13
3.4 Exercício Físico.....	13
3.4.1 Protocolo de Exercício Físico.....	14
3.5 Coleta de tecido e plasma.....	15
3.6 Histologia.....	15
3.6.1 Preparo das lâminas.....	15
3.6.2 Análise histológica.....	15
3.7 Análise bioquímica.....	16
3.8 Quantificação da expressão de Activina-βA e Folistatina.....	17
3.8.1 Extração de RNA total.....	17
3.8.2 Quantificação do RNA total.....	18

3.8.3	Determinação da integridade do RNA.....	18
3.8.4	Transcrição Reversa.....	19
3.8.5	Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (PCR-RT)..	19
3.9	Análise estatística.....	23
4.	RESULTADOS.....	24
4.1	Massa Corporal.....	24
4.2	Controle Glicêmico.....	25
4.2.1	Teste de Tolerância à Glicose (TTG) (Pré – Exercício).....	25
4.2.2	Teste de Tolerância à Insulina (TTI) (Pré – exercício).....	27
4.2.3	Controle Glicêmico pós-exercício.....	29
4.3	Enzimas hepáticas e lipídios plasmáticos.....	31
4.4	Quantificação da expressão do RNAm de activina β A e folistatina no fígado.....	33
4.5	Alterações morfológicas.....	35
5.	DISCUSSÃO.....	37
6.	CONCLUSÃO	42
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8.	ANEXO.....	55

1. INTRODUÇÃO

A obesidade definida como excesso de gordura corporal, ocorre através da interação complexa entre fatores genéticos, dieta, metabolismo e grau de atividade física. Esta doença se tornou uma epidemia mundial e é importante fator de risco para a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), tipo mais comum de doença crônica do fígado. A DHGNA acomete, aproximadamente, 20-30% da população adulta, porém com uma prevalência maior no grupo de indivíduos com diabetes tipo 2 e obesidade, podendo afetar mais de 75% dos sujeitos na população obesa (Hilden et al, 1977; Bellentani et al, 2000; Falck-Ytter et al, 2001; Bjornsson & Angulo, 2007). A DHGNA inclui um grande espectro de lesões hepáticas que varia de esteatose simples a cirrose (Brunt, 2001; Ramos et al, 2003; Deng et al, 2005; Ahmed et al, 2009).

A DHGNA está associada à obesidade, resistência à insulina ou diabetes tipo 2 e dislipidemia (Knobler et al, 1999; Marchesini et al, 1999). Esta doença hepática inclui todos os indivíduos que tenham esteatose hepática com ou sem inflamação ativa. A esteatohepatite não alcoólica (EHNA) está dentro deste espectro, limitando-se a esteatose hepática com inflamação ativa, que pode progredir para fases mais avançadas como a cirrose e o carcinoma hepático (Deng et al, 2005; Ahmed et al, 2009; Smith et al, 2011).

A EHNA foi descrita pela primeira vez em 1980 por Ludwig et al, sendo caracterizada por fígado gorduroso e hepatite lobular em pacientes sem consumo expressivo de álcool. O diagnóstico desta síndrome requer a exclusão do consumo significativo de álcool e tem como características histopatológicas, lesões causadas pela esteatose hepática que podem ser semelhantes ou idênticas a aquelas encontradas na hepatite alcoólica (Brunt, 2001).

Dentre os indivíduos com EHNA, metade desenvolve fibrose do fígado, 15% a 20% desenvolve cirrose e 3% pode progredir para insuficiência hepática, dependendo da gravidade

é necessário transplante de fígado (Marchesini et al, 1999; Guidorizzi de Siqueira et al, 2005). Existe maior prevalência de EHNA em diabéticos e obesos (Falck-Ytter et al, 2001; Guidorizzi de Siqueira et al, 2005).

Com relação à obesidade, a DHGNA está mais proximamente associada com obesidade central, pois os adipócitos viscerais são mais propensos a lipólise liberando quantidades significantes de ácidos graxos (AG) livres que vão diretamente para o fígado pela veia porta (Guidorizzi de Siqueira et al, 2005; Smith et al, 2011). Este aumento da lipólise nos obesos se deve à insensibilidade à insulina (resistência à insulina) adquirida nos adipócitos, o que prejudica a sua ação anti-lipolítica (Fong et al, 2000). Entre outras condições, dependendo do grau de lesão hepática, o indivíduo pode desenvolver resistência à insulina não relacionada à obesidade (Marchesini et al, 1999).

Pacientes sem obesidade e sem diabetes também podem desenvolver a doença por ingestão de drogas (Berson et al, 1998), desnutrição, e *bypass* jejuno-ileal (Fong et al, 2000; Yndestad et al, 2011).

A insulina estimula o crescimento e diferenciação celulares, e é fundamental no metabolismo de carboidratos e lipídios. Este hormônio anabólico estimula a lipogênese, glicogênese e síntese protéica, promovendo o estoque de substratos no tecido adiposo, fígado e músculo. A insulina também inibe a lipólise, impedindo a ação da lipase hormônio sensível, a glicogenólise e a degradação protéica (Saltiel & Kahn, 2001).

A sinalização da insulina se inicia com a ligação do hormônio ao seu receptor. O receptor de insulina (RI), o principal mediador de sua ação, pertencente à subfamília dos receptores que contêm uma tirosina-quinase intrínseca. O RI é uma proteína tetramérica composta por duas subunidades α e duas subunidades β . A subunidade α inibe a atividade tirosina-quinase da subunidade β funcionando como enzima alostérica. A insulina se liga à

subunidade α levando à inibição da atividade quinase da subunidade β seguida de autofosforilação em tirosina e, logo após, mudança conformacional na subunidade β que aumenta a atividade quinase. Após sua ativação, o receptor de insulina fosforila alguns substratos intracelulares como os substratos do receptor de insulina (IRS-1-4), Shc (Proteína semelhante ao colágeno com homologia Src), JAK-2 (Janus-quinase 2) e Cbl (SAAD et al, 1996; Saltiel & Kahn, 2001). Estas proteínas fosforiladas interagem com outras moléculas de sinalização, recrutando e ativando diversas vias de sinalização incluindo a ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3 quinase) que está ligada às ações metabólicas e mitogênicas da insulina. Portanto, a ação final da insulina é aumentar a captação de glicose no músculo e na gordura e bloquear a produção de glicose pelo fígado inibindo a glicogenólise (Saltiel & Kahn, 2001).

A resistência à insulina é a desregulação destes processos e é o principal fator que promove a esteatose hepática (Saltiel & Kahn, 2001; Lieber et al, 2004). Devido à redução da ação anti-lipolítica da insulina, a lipase hormônio sensível não é inibida provocando aumento da lipólise no tecido adiposo e conseqüente aumento do fluxo dos AG livres para o fígado. Estes AG livres em excesso são esterificados no fígado formando os triglicerídeos que se acumulam nos hepatócitos. Estes triglicerídeos também se acumulam no fígado pela superprodução e baixa liberação da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) devido à disfunção da lipase lipoprotéica provocada pelo aumento de AG livres. Esta disfunção no metabolismo de lipídios, provocada pela resistência insulínica leva ao acúmulo de gordura nos hepatócitos resultando em esteatose hepática (Knobler et al, 1999; Fong et al, 2000).

A esteatose da EHNA geralmente é caracterizada como macrovacuolar, sendo observado um único vacúolo grande no citoplasma do hepatócito deslocando seu núcleo para a periferia (Brunt, 2001; Te Sligte et al, 2004). Em casos mais graves ocorre esteatose

microvacuolar caracterizada por deposição de vários pequenos vacúolos de lipídeo nos hepatócitos mantendo seu núcleo centralizado (Brunt, 2001). A oxidação de AG livres no fígado aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio ativando a peroxidação lipídica (Te Sligte et al, 2004).

Dois produtos da peroxidação lipídica são os principais mediadores da inflamação e da fibrose: o malondialdeído (MDA), que ativa o NF- κ B (fator de transcrição regulador da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão) e o 4-hidroxinonal, que ativa as células satélites hepáticas, principais produtoras de colágeno no fígado e que também está envolvido na formação de corpúsculos hialinos de Mallory e na quimiotaxia dos neutrófilos (Day & James, 1998). Baseado nisto, foi proposto um modelo denominado hipótese de 2 “*hits*” por Day & James em 1998. Segundo eles, alguns pacientes com esteatose nunca progredem para necro-inflamação ou fibrose, porque além da esteatose, que caracteriza o primeiro “*hit*”, são necessários outros fatores (segundo “*hit*”) para o desenvolvimento da EHNA, como o estresse oxidativo levando às várias lesões no fígado.

O diagnóstico da DHGNA requer a realização de biópsia do fígado para completa avaliação e interpretação das características histopatológicas. A avaliação morfológica de rotina utiliza coloração de hematoxilina e eosina para uma avaliação global da arquitetura parenquimatosa, anormalidades dos hepatócitos e infiltrados inflamatórios (Brunt, 2001; Smith et al, 2011).

A EHNA tem como principais características histológicas, a esteatose macrovacuolar, que é facilmente identificada na microscopia óptica, não necessitando de colorações especiais, associado com uma reação necro-inflamatória que consiste de um infiltrado de células mononucleares e neutrófilos provocando balonização hepatocitária. Dependendo do grau de

lesão, estes hepatócitos balonizados podem conter corpos de Mallory (Brunt, 2001; Te Sligte et al, 2004).

A maioria dos estudos gradua de forma semiquantitativa a esteatose macrovacuolar, sendo classificada como discreta, quando compromete de 0 a 33% dos hepatócitos; moderada, quando compromete 33 a 66%; e acentuada, quando compromete mais de 66% dos hepatócitos (Brunt, 2001; Kleiner et al, 2005).

A EHNA é caracterizada por diferentes padrões de fibrose. A deposição de colágeno inicial é observada nos espaços perivenular e perisinusoidal da zona 3. O colágeno pode envolver células isoladamente, em um padrão conhecido como fibrose pericelular ou em “cerca de galinheiro” (do inglês *chicken wire*). Esse padrão de fibrose distingue as esteatoepatites, alcoólica e não alcoólica, de outras formas de doenças metabólicas crônicas do fígado, que têm como base fibrose portal (Brunt, 2001).

Estas características histológicas foram categorizadas especificamente em 4 tipos por Matteoni et al (1999), refletindo a progressão inflamatória e fibrose no espectro de lesões da DHGNA. Tipo 1 é apenas a esteatose simples, tipo 2 é a esteatose simples mais inflamação lobular, tipo 3 é a esteatose simples mais balonização hepatocitária, e o tipo 4 é a esteatose simples, a balonização com degeneração hialina de Mallory ou com fibrose (Matteoni et al, 1999).

Em animais, a literatura cita modelos experimentais utilizados mais comumente para induzir a DHGNA. Os modelos de animais geneticamente modificados levando a hiperfagia; manipulação nutricional com dietas deficientes em metionina/colina; utilização de agentes farmacológicos que inibem a síntese e secreção de lipoproteínas e os modelos de dietas hiperlipídicas (Deng et al, 2005; Ahmed et al, 2009). A obesidade nos humanos tem como causa principal a alimentação hipercalórica e dieta rica em gordura. Sendo assim,

consideramos o modelo experimental que utiliza a dieta hiperlipídica como indutor de obesidade, aquele que melhor reflete o que ocorre com os humanos (Deng et al, 2005).

Deng et al (2005) relatam que a dieta hiperlipídica leva à obesidade moderada e desenvolvimento de esteatose simples, porém sem inflamação. No entanto, Lieber et al (2004) relatam que o aumento da esteatose hepática simples como também o estresse oxidativo que levam aos danos de inflamação e fibrose no fígado (EHNA) foram reproduzidos por este modelo experimental. Os animais do modelo experimental de Lieber et al (2004) também desenvolveram resistência à insulina. Utilizando o mesmo modelo experimental de Lieber et al (2004), Ahmed et al (2009) relatam que a dieta reproduziu a esteatose microvesicular, porém os animais não desenvolveram as mesmas características histológicas do outro estudo, devido aos fatores genéticos e/ou ambientais.

Atualmente, não há um tratamento específico para DHGNA ou EHNA, entretanto, mudanças no estilo de vida como o aumento de atividade física e diminuição na ingestão de dietas hipercalóricas ajudam na perda e/ou manutenção da massa corporal. O aumento da prática de atividades físicas tem se tornado uma ferramenta não farmacológica estratégica no tratamento e controle da obesidade e resistência à insulina (Saris et al, 2003; O'Donovan et al, 2005).

O exercício físico está envolvido na melhora da homeostase da glicose e aumento da sensibilidade à insulina e é fundamental para a prevenção e tratamento do diabetes tipo 2 (Colberg et al, 2010). Foi demonstrado que o exercício físico tem efeitos positivos na prevenção e diminuição da esteatose hepática, possivelmente agindo diretamente nos mecanismos intra-hepáticos que poderiam afetar a regulação da metabolização de gordura (Lavoie & Gauthier, 2006; He et al, 2008; Sene-fiorese et al, 2008; Bergasa et al, 2004; Schultz et al, 2010).

A activina A tem sido apontada como um fator da patogenia da DHGNA, estando envolvida na formação de fibrose e acúmulo de lipídeos (Yndestad et al, 2009; Yndestad et al, 2011). A activina é membro da superfamília do fator β de transformação e crescimento (TGF- β), assim como as Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs), Fatores de Diferenciação e Crescimento (GDFs) e Miostatina (Takabe et al, 2003; Rodgarkia-Dara et al, 2006; Deli et al, 2008; Yndestad et al, 2009). As activinas são proteínas diméricas bioativas sendo compostas por duas subunidades β ligadas por pontes dissulfeto. São consideradas homodímeros quando compostas por duas subunidades β semelhantes como a activina A ($\beta A\beta A$) ou activina B ($\beta B\beta B$), e heterodímeros, quando suas subunidades são diferentes como na activina AB ($\beta A\beta B$), sendo cada uma codificada por um único gene. A família das activinas é composta por outras subunidades, ainda pouco caracterizadas, como βC , βD e βE . As subunidades βC e βE foram identificadas em mamíferos e βD foi descoberta apenas no *Xenopus leavis* (Rodgarkia-Dara et al, 2006; Werner et al, 2006).

A activina foi inicialmente identificada como um fator estimulador do hormônio folículo-estimulante (FSH), sintetizado e secretado pelos gonadotrofos na hipófise anterior (Rodgarkia-Dara et al, 2006; Werner et al, 2006). Por meio de análises da expressão tecidual das subunidades de activina, foi possível detectar a alta expressão da βA e βB na maioria dos tecidos e tipos celulares. A expressão das subunidades βC e βE , em contraste, são predominantemente expressas no fígado (Rodgarkia-Dara et al, 2006; Deli et al, 2008).

As subunidades β da activina são sintetizadas como moléculas precursoras com 350-426 aminoácidos e pesos moleculares entre 38 kDa e 50 kDa. Estas subunidades β contêm 9 cisteínas conservadas nos peptídeos maduros. A sexta cisteína é usada para dimerização, considerando que as outras oito cisteínas formam pontes de dissulfeto intra-molecular que determinam a estrutura tridimensional dos peptídeos (Deli et al, 2008).

Os efeitos biológicos das activinas são mediados por receptores transmembrana serina/treonina quinase que se iniciam com a ligação do peptídeo ao receptor tipo II (TbR-II, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II, AMHR-I) que recruta e fosforila o receptor tipo I (Activin Receptor-Like kinase - ALKs 1 – 7). Estes receptores fosforilados por sua vez, recrutam mediadores intracelulares denominados Smads, que são responsáveis por enviar o sinal da activina até o núcleo celular, regulando a transcrição de genes-alvos (Rodgarkia-Dara et al, 2006; Deli et al, 2008; Hashimoto & Funaba, 2011; Yndestad et al, 2011).

Dentre as activinas, a activina A foi investigada mais extensivamente (Rodgarkia-Dara et al, 2006). A activina A é um homodímero composto por 2 subunidades βA , e tem sido mais recentemente reconhecida como uma citocina multifuncional expressa em uma ampla variedade de células e tecidos, com funções regulatórias importantes na biologia reprodutiva, desenvolvimento embrionário, inflamação e apoptose, diferenciação celular e reparação tecidual (Chabicovsky et al, 2003; Rodgarkia-Dara et al, 2006; Deli et al, 2008; Yndestad et al, 2009). A activina A está envolvida na patogênese de várias doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais e aterosclerose, e também em vários distúrbios hepáticos (Werner & Alzheimer, 2006).

As subunidades da activina e seus receptores são expressos no fígado adulto normal. A regulação descontrolada da expressão desta proteína, principalmente da subunidade βA , está associada a alterações hepáticas que cursam com inflamação, insuficiência hepática aguda e carcinoma hepatocelular (CHC) (Takabe et al, 2003; Deli et al, 2008; Yndestad et al, 2009). A activina também é considerada um regulador negativo do crescimento hepático, pela inibição da replicação dos hepatócitos e indução de apoptose (Takabe et al, 2003; Rodgarkia-Dara et al, 2006; Yndestad et al, 2009). Chabicovsky et al (2003) usaram um sistema de transferência não viral de genes que levou genes codificadores das subunidades βA , βC e βE de activina

para o fígado de ratos. A expressão destas subunidades inibiu temporariamente a síntese de DNA regenerativo de hepatócitos e células não parenquimatosas, sustentando a hipótese do envolvimento das activinas C e E na homeostase do tecido hepático e enfatizando o provável envolvimento destas proteínas no crescimento do fígado (Chabicovsky et al, 2003). Já Gold et al (2005) relacionou o aumento da expressão protéica da subunidade β A no fígado com apoptose de hepatócitos e o aumento da subunidade β C com a mitose de hepatócitos, sugerindo ação autócrina dessas proteínas.

As activinas apresentam um papel importante na inflamação e fibrose do fígado, tendo sido observado que além da subunidade β A, a subunidade β C é fortemente expressa em fígados fibróticos de ratos, pois nesta situação as activinas produzidas pelos hepatócitos ativam as células estelares hepáticas aumentando a expressão de colágeno (Werner et al, 2006).

Segundo Rodgarkia-Dara et al (2006), é encontrada alta expressão das subunidades β A, β C e β E no fígado fibrótico de ratos. Este achado é corroborado por Deli et al (2008), que observou níveis elevados de subunidade β A de activina em fígados fibróticos e cirróticos de ratos. Já, o estudo de Yndestad et al (2009) mostrou que pacientes com DHGNA têm níveis circulantes de activina A elevados, sugerindo que activina A poderia ser um marcador não invasivo de EHNA indicando fibrose hepática.

Quanto à modulação do metabolismo lipídico, Yndestad et al (2009), observaram que a activina A suprime potencialmente enzimas importantes para a lipogênese hepática e aumenta a atividade de enzimas responsáveis pela β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos.

A ação da activina é regulada por fatores intra e extra-celulares, dentre eles, a folistatina, um polipeptídeo de cadeia simples, que se liga à activina com alta afinidade abolindo completamente a ligação da activina A com seu receptor e bloqueia a sua sinalização

(Takabe et al, 2003; Rodgarkia-Dara et al, 2006; Deli et al, 2008). Segundo Rodgarkia-Dara et al (2006), a administração de folistatina atenuou a formação de fibrose no fígado de ratos e acelerou a regeneração do fígado após hepatectomia parcial, porém prejudicou a restauração da estrutura do tecido normal e comprometeu a função do fígado. Do mesmo modo, Takabe et al (2003) observaram que a superexpressão de folistatina mediada por adenovírus, aumentou a proliferação de hepatócitos provocando significativo aumento do fígado intacto.

Estudos mostram que a folistatina pode ser modulada pelo exercício físico, no músculo e no tecido adiposo de animais diabéticos e obesos (Bueno et al, 2011; Dutra et al, 2012). Um estudo recente também aponta que a folistatina plasmática aumenta em resposta ao exercício, sendo esta resposta, mais provavelmente, originada do fígado (Hansen et al, 2011). Entretanto, não existem evidências diretas que mostram a relação entre o exercício e a activina.

Outro fator que regula a activina, mais especificamente a activina E, é a insulina. *In vitro*, a insulina promove “up-regulation” da activina E sugerindo que esta subunidade de activina possui papel fisiopatológico no metabolismo da glicose. Entretanto, no estado de jejum, a expressão do RNAm de activina E no fígado está aumentada, quando os níveis de insulina estão diminuídos (Hashimoto et al, 2009).

Embora as evidências sugiram a participação da activina na patogênese da DHGNA e que o exercício físico é uma ferramenta estratégica no tratamento desta doença, pouco se conhece da participação do eixo activina–folistatina neste processo e sua resposta ao exercício. Os animais com obesidade e resistência insulínica induzidas por dieta hiperlipídica constituem um modelo atraente para investigação. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o padrão de expressão hepática de activina A e folistatina em ratos obesos submetidos ao exercício de natação.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do exercício físico sobre a expressão de activina A e de folistatina no fígado de animais resistentes à insulina e obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Condições Experimentais

Ratos Wistar, adultos, pesando $190 \pm 18,4$ g (média \pm erro padrão da média) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e utilizados para a realização dos experimentos. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia, do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), sob condições constantes de temperatura (22°C), umidade e iluminação (8-18h: claro; 18-8h: escuro) e com oferta de água e dieta *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Protocolo n. 035/2007).

Todos os animais permaneceram durante uma semana em condições de aclimatação com dieta padrão *ad libitum*.

Após este período, os animais foram divididos em 2 grupos:

- 1) Grupo controle – C (n = 15): animais alimentados com dieta padrão por 12 semanas.
- 2) Grupo dieta hiperlipídica – DH (n = 15): animais alimentados com dieta hiperlipídica por 12 semanas.

As dietas padrão e hiperlipídica tinham a seguinte composição:

Dieta Padrão:

A dieta da marca PRIMOR (São Paulo, Brasil) contém em 100g da dieta: 23g proteína e densidade calórica de 2,57 Kcal/g, conforme informações fornecidas pelo fabricante.

Dieta Hiperlipídica:

A dieta produzida e comercializada por Research Diets (New Brunswick, NJ), código D12492, é composta por 20% de proteína, 20% de carboidrato, 60% de lipídios e densidade calórica de 5,24 Kcal/g.

3.2 Controle de Ingestão Alimentar e Massa Corporal

A ingestão alimentar e o peso corporal foram mensurados diariamente, às 08:00h, durante todo o período experimental.

3.3 Controle Glicêmico

Para a determinação da glicemia, foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais, para tanto, foi utilizado glicosímetro portátil (*Accu-Chec Active*).

3.3.1 Teste de Tolerância à Glicose (TTG)

Após o período de aclimação (TTG inicial) e ao final das semanas de tratamento 3, 4, 8 e 12 foi realizado TTG. Os animais permaneceram em jejum, no período noturno, e às 08:00h do dia seguinte receberam injeção intraperitoneal de glicose, 1,5 g/Kg peso, diluído em salina (NaCl 0,9%) (Fujiwara et al, 2007). Foram coletadas amostras nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose.

3.3.2 Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

Após o período de aclimação (TTI inicial) e ao final das semanas de tratamento 8 e 12, e com intervalo de 2 dias entre os testes de TTG, foram realizados testes de TTI. Os animais permaneceram em jejum no período noturno, e às 08:00h do dia seguinte receberam injeção intraperitoneal de insulina 1 U/kg peso (Fujiwara et al, 2007). Foram coletadas amostras nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a injeção de insulina.

3.4 Exercício Físico

Ao final das 12 semanas, os animais dos grupos controle e dieta hiperlipídica foram subdivididos em dois grupos, ficando os animais distribuídos agora em 4 grupos diferentes:

1) Grupo Controle Sedentário (n=6) - CS: os animais recebiam dieta padrão e mantinham-se sedentários durante 4 semanas;

2) Grupo Controle Exercício (n=6) - CE: os animais recebiam dieta padrão e exercitavam-se durante 4 semanas;

3) Grupo Dieta Hiperlipídica Sedentário (n=6) - DHS: os animais recebiam dieta hiperlipídica e mantinham-se sedentários durante 4 semanas;

4) Grupo Dieta Hiperlipídica Exercício (n=6) - DHE: os animais recebiam dieta hiperlipídica e exercitavam-se durante 4 semanas.

3.4.1 Protocolo de Exercício Físico

Os animais do grupo exercício foram submetidos a exercício na modalidade natação, em 2 sessões diárias de 45 minutos, às 09:00 e às 17:00h, com frequência de 5 vezes por semana, durante 4 semanas. O exercício era realizado em tanques individuais (50 cm de altura x 30 cm de diâmetro) com água em temperatura controlada (34°C) e com sobrecarga atada à cauda para garantir que o animal não flutuasse e se mantivesse em atividade durante toda a sessão (Voltarelli et al, 2002). Essa sobrecarga teve um acréscimo de 1% a cada semana até atingir 5% da massa corporal, permanecendo assim até o final da quarta semana (Matsakas et al, 2006; Leme et al, 2007; Sene-Fiorese et al, 2008)

Para adaptação dos animais ao exercício, nos primeiro e segundo dias, a natação era realizada sem adição de carga na cauda, por duração de 1h (2 x 30 min), e no terceiro dia o exercício foi realizado com duração de 90 minutos (2 x 45 min) sem adição de carga.

Durante o período de exercício, os grupos sedentários permaneciam durante 5 minutos em tanques, iguais ao do grupo exercício, com água rasa (5 cm) na mesma temperatura, simulando o estresse de exposição à água (Király et al, 2007; Matsakas et al, 2005)

Ao final do protocolo de exercício foi realizado novamente o TTG.

3.5 Coleta de tecido e plasma

Os animais foram decapitados 24 horas após a última sessão de exercício. O fígado foi dissecado, pesado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80°C para posterior análise. O plasma foi coletado e armazenado à -20°C.

3.6 Histologia

3.6.1 Preparo das lâminas

Fragmentos de fígado foram fixados em solução formol 10% tamponada, desidratados em soluções de concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol, impregnados em parafina e após este processo os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram realizados no micrótomo Micron® HM 360, estendidos e colocados no centro de lâminas de vidro. Logo após foi feita a secagem dos cortes na estufa. Antes da coloração os cortes passaram por processos de desparafinação em xilol, em seguida, a alcoolização pelo álcool etílico e finalmente, a hidratação em água destilada sendo corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson posteriormente. Após a coloração os cortes foram desidratados em álcool e diafanizados em xilol. Para a montagem das lâminas os cortes foram embebidos em Bálsamo do Canadá (*Pró-cito, Produtos Citológicos Soldan, Porto Alegre, Rio Grande do Sul*) e cobertos com uma lamínula de vidro (Michalany, 1998).

3.6.2 Análise Histológica

A presença de esteatose foi classificada da seguinte forma: discreta quando comprometia de 0 a 33% dos hepatócitos; moderada quando comprometia 33 a 66% e acentuada quando comprometia mais de 66% dos hepatócitos. Outros parâmetros avaliados

foram presença ou ausência de infiltrado inflamatório, o tipo de infiltrado inflamatório, a presença ou ausência de fibrose periportal e o grau de fibrose (tabela I) (Kleiner et al, 2005).

A análise das lâminas de tecido hepático foi feita em microscópio óptico da marca *Olympus® modelo BX 51*, por um patologista, em estudo cego quanto aos grupos controle e experimental.

Tabela I. Sistema de escore de atividade histológica da DHGNA

Escore de atividade histológica da DHGNA: 0-8	
Grau de esteatose	0: <5% 1: 5-33% 2: 34-66% 3: >66%
Infiltrado inflamatório	0: nenhuma 1: <2 focos no campo óptico de 20x 2: 2-4 focos no campo óptico de 20x 3: >4 focos no campo óptico de 20x
Balonização hepatocelular	0: ausente 1: leve 2: moderada/acentuada
Fibrose	0: nenhuma 1: perisinusal e periportal 2: perisinusal e portal/periportal 3: fibrose em ponte 4: cirrose

DHGNA, Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (Tiniakos, 2010).

3.7 Análise bioquímica

As enzimas hepáticas e os lipídios plasmáticos foram mensurados enzimaticamente em analisador bioquímico (*Prietest Touch, Robonik PVT Ltd., Índia*). A alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e gama glutamil-transferase (GGT) foram mensurados enzimaticamente pelo método cinético utilizando os kits de ensaio comerciais disponíveis (*Katal Biotecnológica, Minas Gerais*). Os lipídios plasmáticos, colesterol e triglicérides total,

foram mensurados pelo método enzimático colorimétrico utilizando os kits de ensaio comerciais disponíveis (*Katal Biotecnológica, Minas Gerais*).

3.8 Quantificação da expressão de Activina-βA e Folistatina

A quantificação da expressão hepática da subunidade βA de activina e folistatina foi realizada pela quantificação do seu RNA mensageiro por PCR-RT.

3.8.1 Extração de RNA total

No dia da extração, 40 mg de tecido foi homogenizado (*Homogenizador Power Gen – Fisher Scientific 1000*) em TRIzol® (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, California*) (1ml) segundo o seguinte protocolo:

- Fígado.

Após homogeneização, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as amostras foram agitadas no *Vortex* durante 15 segundos. A seguir as amostras permaneceram em temperatura ambiente (15 – 30° C) por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas (*Eppendorf 5804R*) por 15 minutos, a 12000rpm, a 4° C. Seguindo a centrifugação 450 µL do sobrenadante foi transferido para um microtubo limpo. Foram adicionados 225 µL de isopropanol e 225 µL de acetato de sódio livre de RNase (*Applied Biosystems Inc, Foster City, CA USA*) logo após a amostra foi agitada por inversão manual, permanecendo por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 12000rpm (4°C) e ao sobrenadante foi acrescentado 1 mL de etanol 75%. Após nova centrifugação, por 5 minutos a 7500rpm (4° C), o *pellet* restante permaneceu em temperatura ambiente durante 5 minutos para secagem. Após esse tempo, foram acrescentados 60 µL de água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) 0,1%. As amostras foram então congeladas e armazenadas a -80°C para posterior análise.

3.8.2 Quantificação do RNA total

As amostras de RNA total foram diluídas 20 vezes em água tratada com DEPC e foram feitas as leituras em espectrofotômetro (*Eppendorf*) para determinação das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Foi utilizada a seguinte fórmula para determinar a concentração de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$): concentração $\mu\text{g}/\mu\text{L} = (A_{260} \times 40 \times \text{diluição da amostra}) \times 1000^{-1}$.

O grau de pureza do RNA foi determinado pela razão A_{260}/A_{280} , considerando-se adequados os valores entre 1,8 e 2,0.

3.8.3 Determinação da integridade do RNA

A integridade do RNA foi confirmada pela visualização, em luz ultravioleta, do padrão de eletroforese das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (Figura 1).

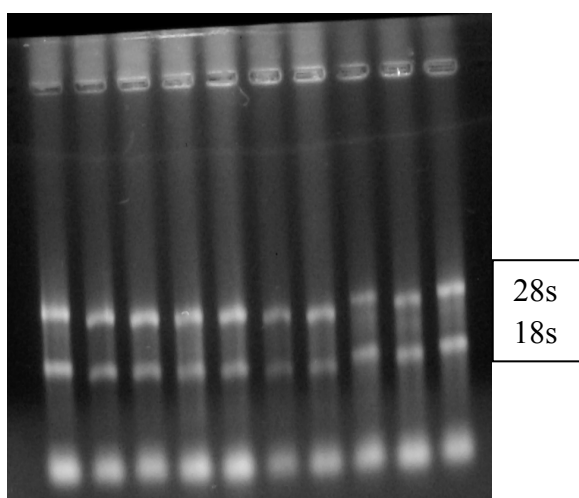


Figura 1. Exemplo de um gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo indicando a integridade do RNA totais, através da visualização das bandas ribossomais 18s e 28s.

3.8.4 Transcrição Reversa

Inicialmente, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase - Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (*Invitrogen Corporation, Carlsbad, California*). Ao RNA total (1 µg), foi adicionada a solução tampão (1 µL, 10X DNase I Reaction Buffer), enzima (1 µL DNase I, Amp Grade) e quantidade suficiente para (QSP) 10 µL de água tratada com DEPC. A amostra foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Logo após, foi adicionado EDTA (1 µL) e a amostra permaneceu em banho seco a 65° C por 10 minutos.

Logo após o tratamento com DNase, foi adicionado 0,5 µL do primer Oligo (dT) 15 (*Promega Corporation, Madison, WI USA*) e a amostra permaneceu em banho seco a 70° C por 5 minutos.

A seguir, foram adicionados:

- 2,5 µL de M-MLV 5x tampão de reação (*Promega Corporation, Madison, WI USA*)
- 0,625 µL dATP 10mM
- 0,625 µL dCTP 10mM
- 0,625 µL dGTP 10mM
- 0,625 µL dTTP 10mM
- 0,5 µL M-MLV RT (transcriptase reverse)

As amostras foram então incubadas por 60 minutos a 37°C e estocadas a -20° C.

3.8.5 Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real (PCR-RT)

Foram utilizados os seguintes reagentes para cada amostra de cDNA (40ng/µL), em duplicata.

- 10,0 µL de água DEPC
- 1,0 µL primer forward
- 1,0 µL primer reverse

- 0,5 μ L de cDNA
- 12,5 μ L SYBR® Green PCR Master Mix (*LGC Biotecnologia Ltda., Cotia, São Paulo*).

As amostras eram processadas no Termociclador *Rotor- Gene, R 3000 (Robertt Research)* e os ciclos foram compostos de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 94°C – 15 segundos; Tm 66°C (Activina β A), Tm 53°C (Folistatina), Tm 70°C (GAPDH) – 30 segundos; 72°C – 60 segundos.

As sequências dos *primers* que foram utilizados são as seguintes (Gold et al, 2003; Ferreira et al, 2008) (Tabela II):

Tabela II. Sequência de *Primers*

RNA _m	<i>Primer</i> Senso	<i>Primer</i> Antisenso
Activina β A	ATGGACCTAACTCTCAGCCAGA	CTCTCCCCCTTCAAGCCCAT
Folistatina	GGCGTACTGCTTGAAGTGAA	GGGAAGCTGTAGTCCTGGTC
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG	GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA

A construção de uma curva padrão para os genes activina β A, folistatina e GAPDH foi feita amplificando-se diluições seriadas, em duplicata, do cDNA do fígado de ratos em uma proporção de 1:10, onde iam de uma amostra contendo o cDNA puro até uma diluição de 1/100. Esta curva padrão que é analisada por meio de regressão linear foi utilizada para padronizar temperatura de anelamento (T_m) e concentração dos primers (Figura 2).

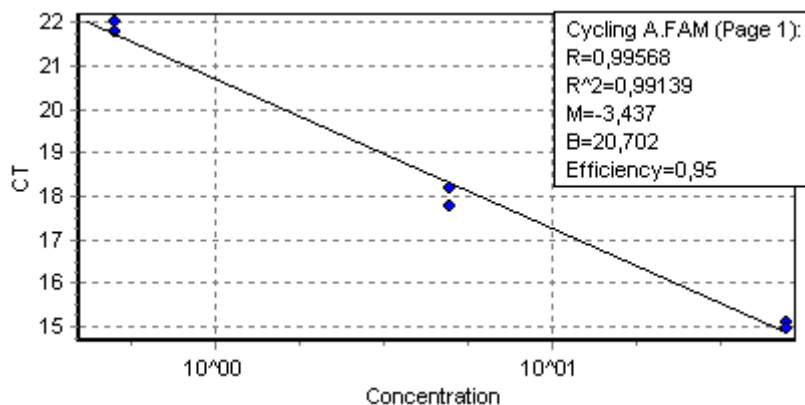


Figura 2. Exemplo de regressão linear da Curva Padrão do gene GAPDH no fígado.

Os produtos específicos foram determinados como picos únicos por meio das curvas de MELT (figura 3).

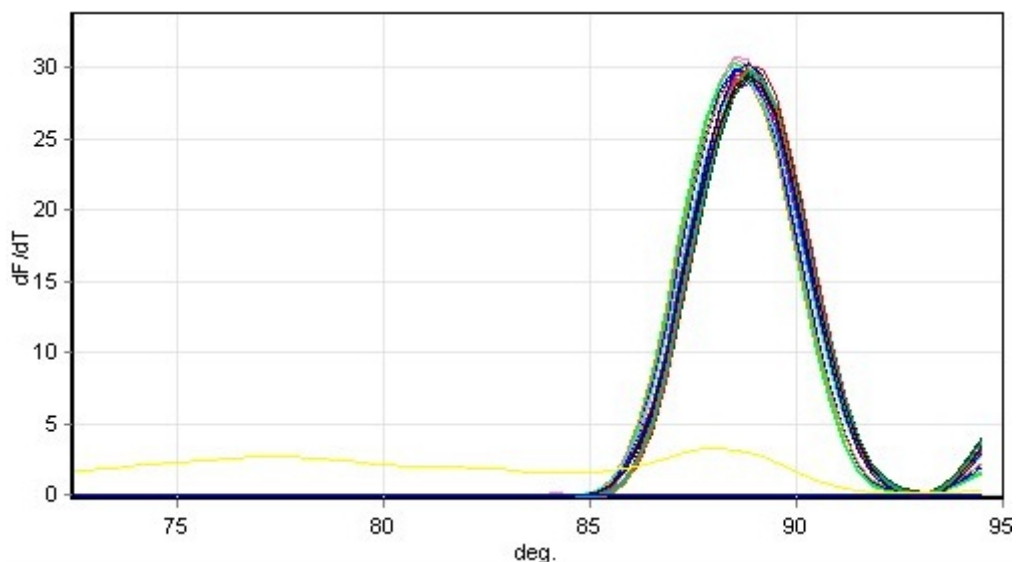


Figura 3. Exemplo de Curva de MELT Original Representativa dos ciclos do PCR-RT dos genes GAPDH no fígado.

Os valores de Ct (Threshold cycle) e as curvas de MELT foram fornecidos pelo *Software* Rotor Gene – 6. O Ct é o ponto onde o sinal de fluorescência é notado pela primeira vez com o menor número de ciclos durante a fase exponencial da amplificação (figura 4).

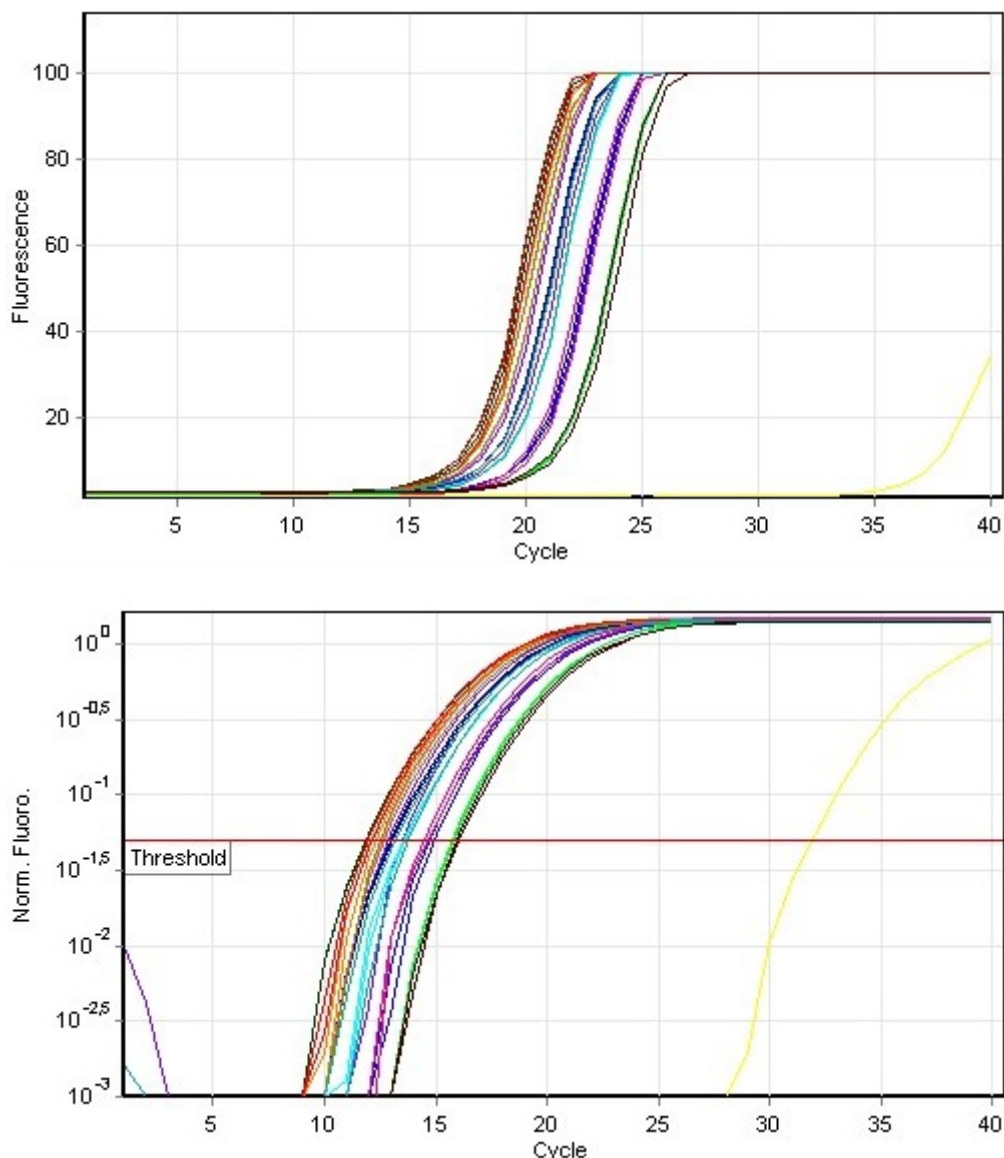


Figura 4. Exemplo de Curva de Amplificação Original Representativa dos ciclos do PCR-RT do gene GAPDH no Fígado.

O nível de expressão comparativa de cada condição foi calculado pelo método de $\Delta\Delta C_t$. Depois de calculada a média dos C_t de cada gene (GAPDH, Activina βA e Folistatina) foi realizado:

- ΔC_t (delta C_t) = C_t Activina βA - C_t GAPDH ou C_t Folistatina - C_t GAPDH, seguindo:
- Cálculo da média S: Média do ΔC_t , seguindo:
- $\Delta\Delta C_T$ (delta delta C_T): ΔC_T - média S

Os $\Delta\Delta C_T$ dos grupos controle sedentário, controle exercício e dieta hiperlipídica sedentário foram calculados em relação ao grupo controle sedentário e o $\Delta\Delta C_T$ do grupo dieta hiperlipídica exercício foi calculado em relação ao grupo dieta hiperlipídica sedentário que é o controle para esse grupo. O valor em UA (unidades arbitrárias) da expressão da Activina βA foi calculado por $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Com os valores em UA foram utilizados os testes estatísticos.

3.9 Análise Estatística

Inicialmente, foi testada a normalidade da distribuição dos dados. Para as amostras de distribuição normal foram utilizados o teste t student e análises de variância (ANOVA). O teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para análise post-hoc de comparações entre grupos. O teste Fisher's Exact foi usado para variáveis categóricas. Os valores estão representados como média \pm EPM (erro padrão da média). O nível de significância estatística adotado foi de $P < 0,05$. As análises dos dados foram realizadas no programa estatístico *STATISTICA*[®] (data analysis software system) versão 7.

4. RESULTADOS

4.1 Massa corporal

A massa corporal nas quatro primeiras semanas de experimento, não foi diferente entre os grupos, porém, a partir da quinta semana o peso do grupo dos animais alimentados com dieta hiperlipídica (DH) foi significativamente maior comparado com o peso dos animais controle (C) até o final do período de treinamento (Figura 5). Na décima sexta semana, tanto o grupo controle exercício (CE) quanto o grupo dieta hiperlipídica exercício (DHE) tiveram massa corporal significativamente menor comparados aos animais sedentários controle e alimentados por dieta hiperlipídica, respectivamente. A massa corporal pós-exercício na décima sexta semana foi significativamente menor que a massa corporal pré-exercício na décima segunda semana no grupo dieta hiperlipídica. Contudo, os pesos corporais pré- e pós-exercício dos grupos controle sedentário e controle exercício não foram diferentes.

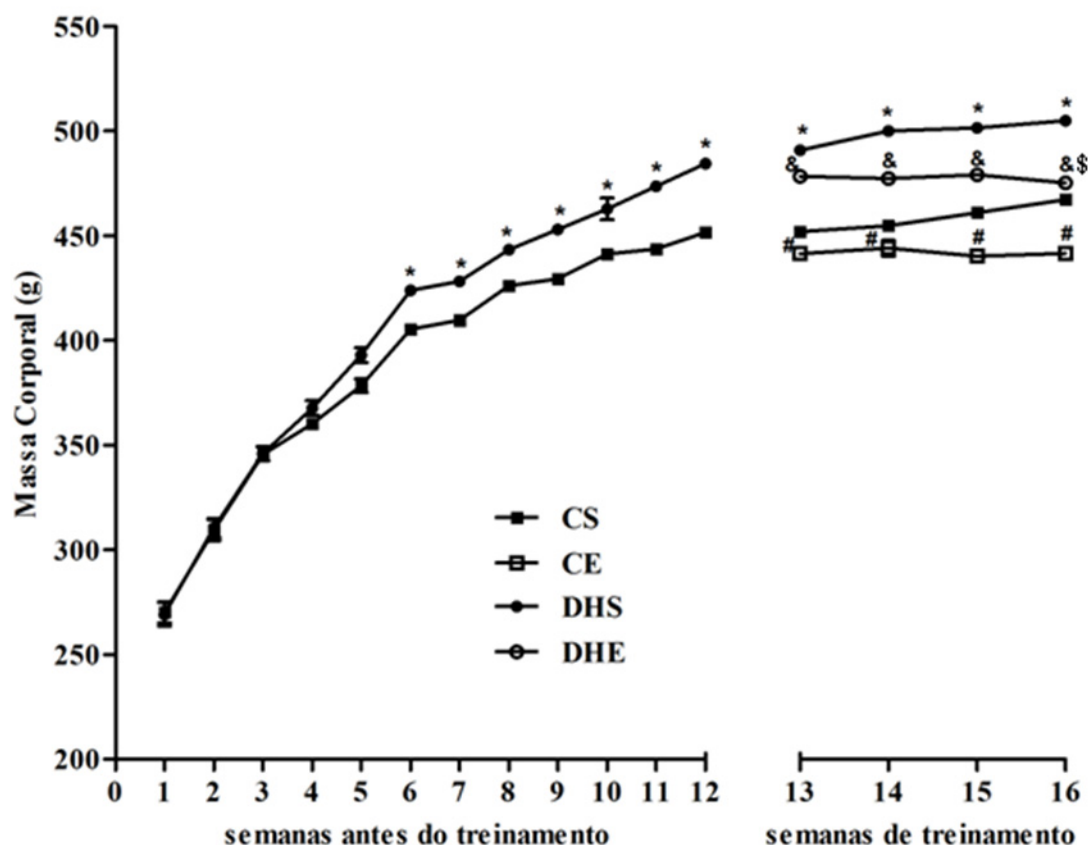


Figura 5. Massa corporal (g) de animais controle e alimentados por dieta hiperlipídica. Os valores estão representados como média \pm EPM (erro padrão da média). CS=Controle Sedentário; CE=Controle Exercício; DHS=Dieta Hiperlipídica Sedentário; DHE=Dieta Hiperlipídica Exercício ($P < 0.05$), * CS vs DHS; # CS vs CE; & DHS vs DHE, \$ DHE pré-exercício VS DHE pós-exercício.

4.2 Controle glicêmico

4.2.1 Teste de tolerância à glicose (TTG) (pré-exercício)

No TTG inicial realizado após período de aclimação e antes do início do tratamento dietético, não foram observadas diferenças nas concentrações de glicose plasmática no grupo DH quando comparado ao grupo C. Após 3 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, o grupo DH apresentou concentrações de glicose plasmática significativamente superiores quando comparado ao grupo C. O mesmo foi observado ao final da 4^a, 8^a e 12^a semanas (figura 6).

A partir da 4ª semana de tratamento com dieta hiperlipídica os animais do DH apresentaram glicemia de jejum significativamente maior em relação ao grupo controle.

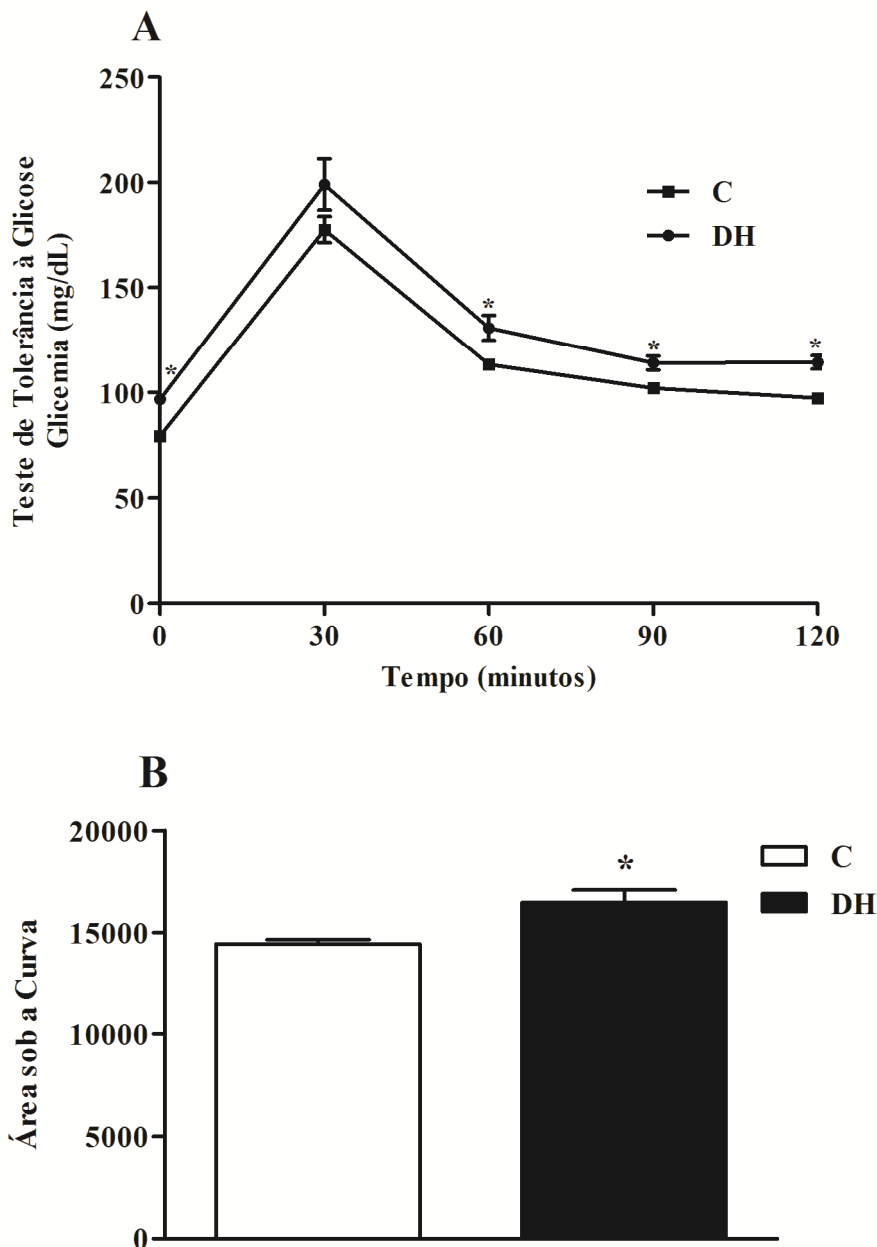


Figura 6. (A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) ao final da décima segunda semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e (B) Área sob a curva do TTG. Valores apresentados como média \pm EPM. $n = 15$ ratos/grupo. DH=Grupo dieta hiperlipídica e C=Grupo controle. * $P < 0.05$, DH comparado ao C.

4.2.2 Teste de Tolerância à Insulina (TTI) (Pré – exercício)

No TTI inicial realizado após período de aclimatação e antes do início do tratamento dietético, não foram observadas diferenças nas concentrações de glicose plasmática no grupo DH quando comparado ao grupo C.

Entretanto, após 8 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica, o grupo DH apresentou concentrações de glicose plasmática significativamente superiores quando comparado ao grupo C. O mesmo foi observado ao final da 12^a semana (figura 7).

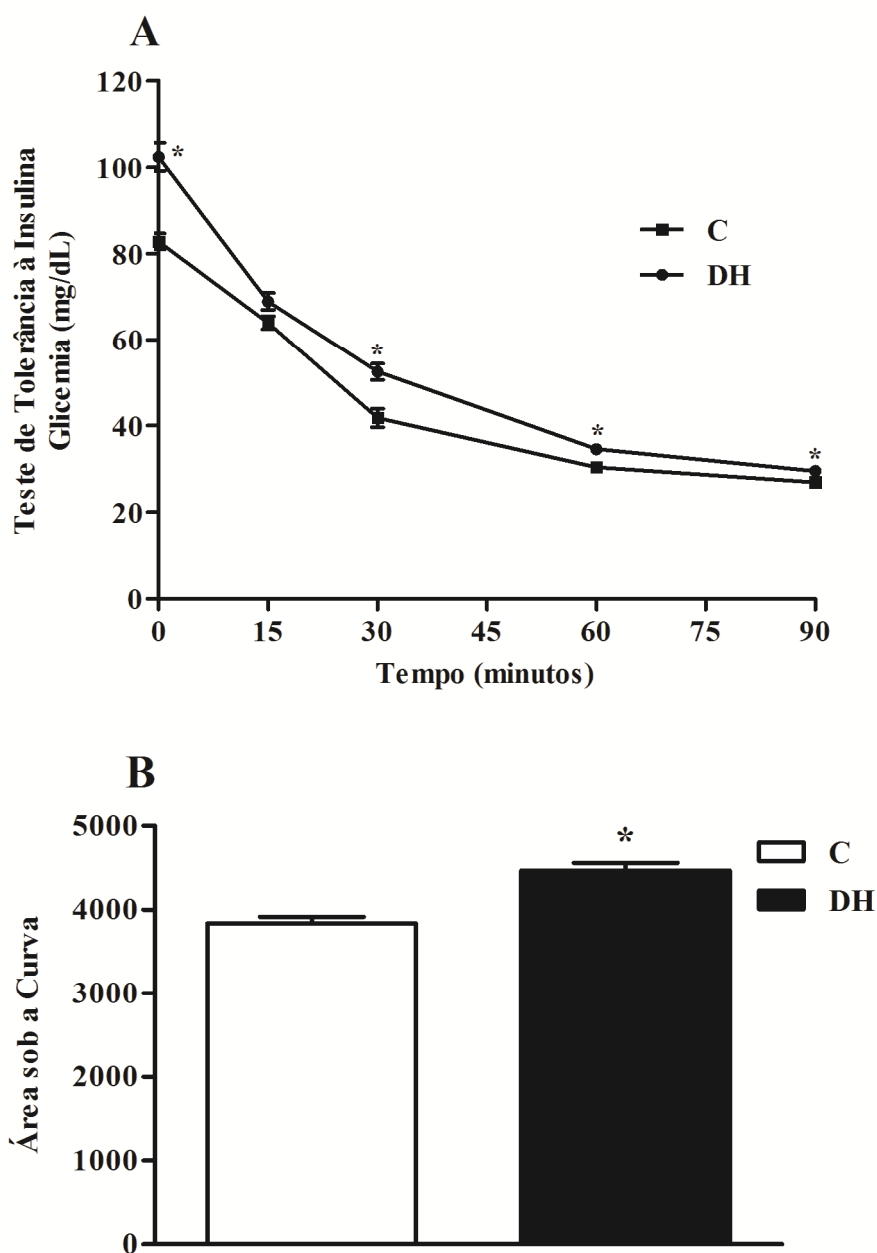


Figura 7. (A) Teste de Tolerância à Insulina (TTI) ao final da décima segunda semana de tratamento dietético com dieta hiperlipídica e (B) Área sob a curva do TTI. Valores apresentados como média \pm EPM. $n = 15$ ratos/grupo. DH=Grupo dieta hiperlipídica e C=Grupo controle. * $P < 0.05$, DH comparado ao C.

4.2.3 Controle glicêmico pós-exercício

Após as 4 semanas de exercício de natação, os animais do grupo DHE pós - exercício apresentaram redução significativa da concentração de glicose no TTG quando comparado ao TTG antes do exercício (DHE pré - exercício), mostrando aumento da sensibilidade à insulina neste grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos que receberam dieta padrão pré e pós - exercício (Figura 8).

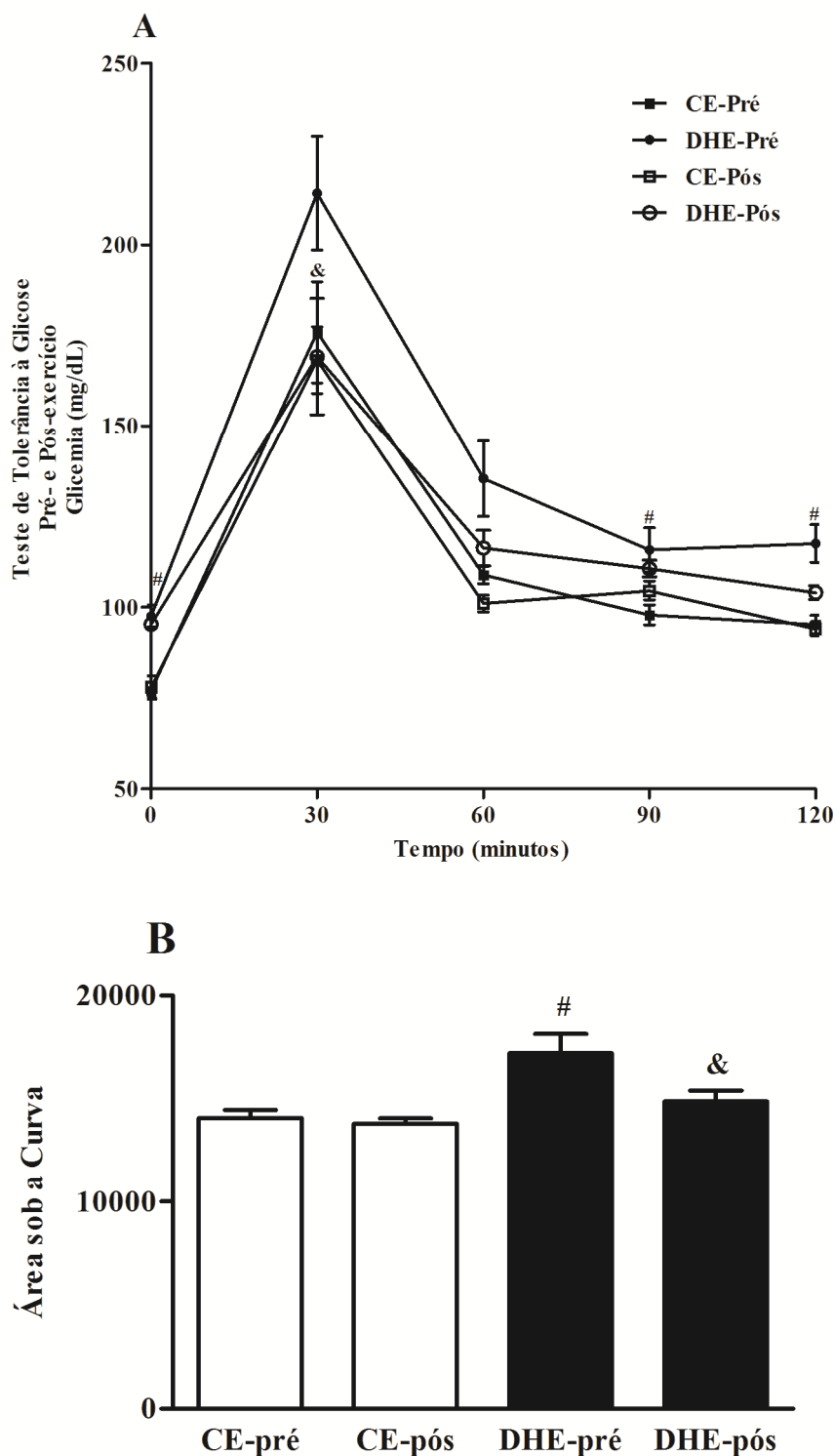


Figura 8. (A) Teste de Tolerância à Glicose (TTG) Pré- e Pós-exercício e (B) Área sob a curva do TTG pré- e pós-exercício. Valores apresentados como média \pm EPM. $n = 6-8$ ratos/grupo. DHE pré=Grupo dieta hiperlipídica antes do exercício, DHE pós=Grupo dieta hiperlipídica após o exercício, CE pré=Grupo controle antes do exercício, CE pós=Grupo controle após o exercício. & $P < 0.05$, DHE pós comparado ao DHE pré., # CE pré vs DHE pré.

4.3 Enzimas hepáticas e lipídios plasmáticos

Considerando a enzima hepática alanina transaminase (ALT), observamos aumento da enzima no grupo DHS em comparação com o seu grupo controle (CS). Notamos ainda que o exercício diminuiu a concentração plasmática da ALT no grupo DHE, o que não ocorreu no grupo DHS (Figura 9).

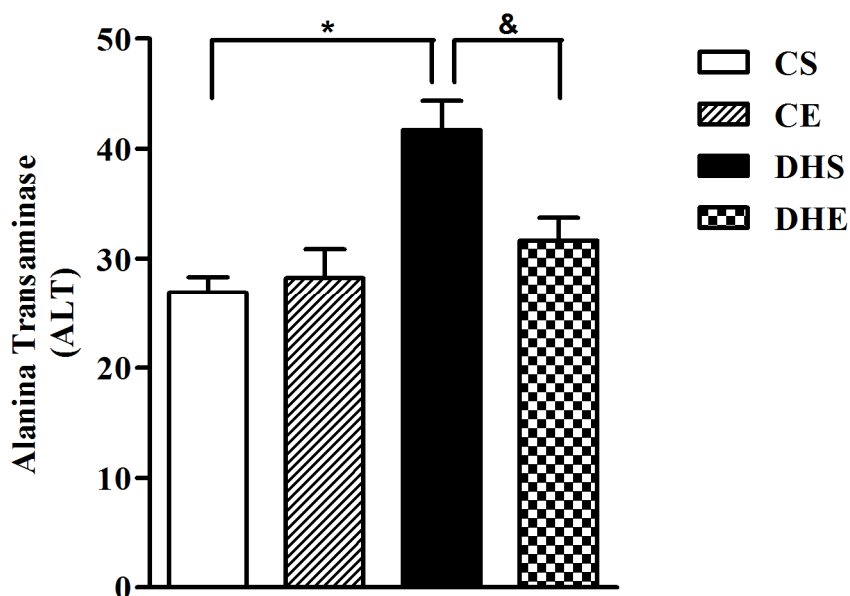


Figura 9. Dosagem da enzima hepática Alanina Transaminase (ALT) do plasma de ratos. Valores são médias \pm erro padrão da média. CS=Controle Sedentário; CE=Controle Exercício; DHS=Dieta Hiperlipídica Sedentário; DHE=Dieta Hiperlipídica Exercício ($P < 0.05$), * CS vs DHS; # CS vs CE; & DHS vs DHE.

Em relação as enzimas aspartato transaminase (AST) e Gama glutamil-transferase (GGT), não houve diferença significativa entre os grupos (Figuras 10 e 11). O mesmo foi observado com os lipídios plasmáticos, colesterol e triglicérides (Figuras 12 e 13).

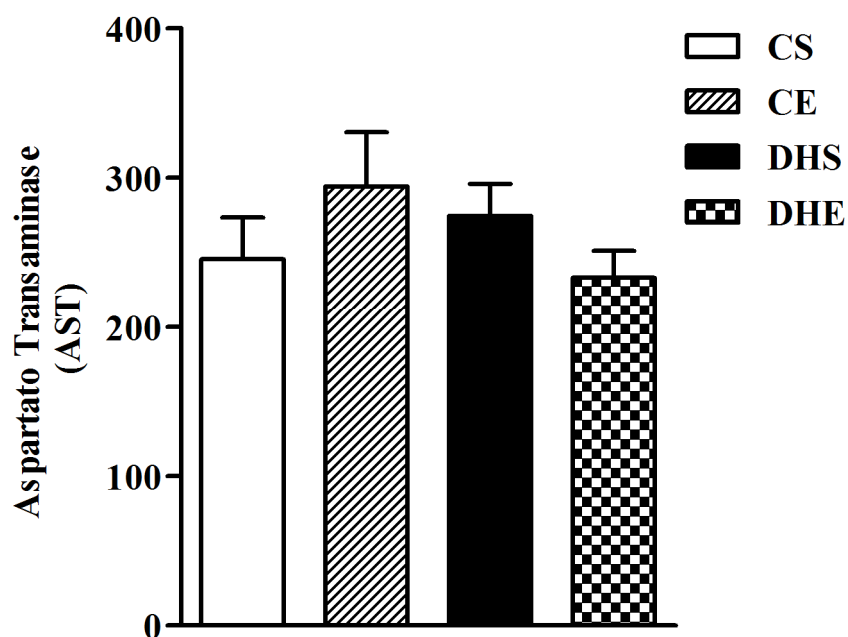


Figura 10. Dosagem da enzima hepática Aspartato Transaminase (AST) do plasma de ratos. Valores são médias \pm erro padrão da média. CS=Controle Sedentário; CE=Controle Exercício; DHS=Dieta Hiperlipídica Sedentário; DHE=Dieta Hiperlipídica Exercício.

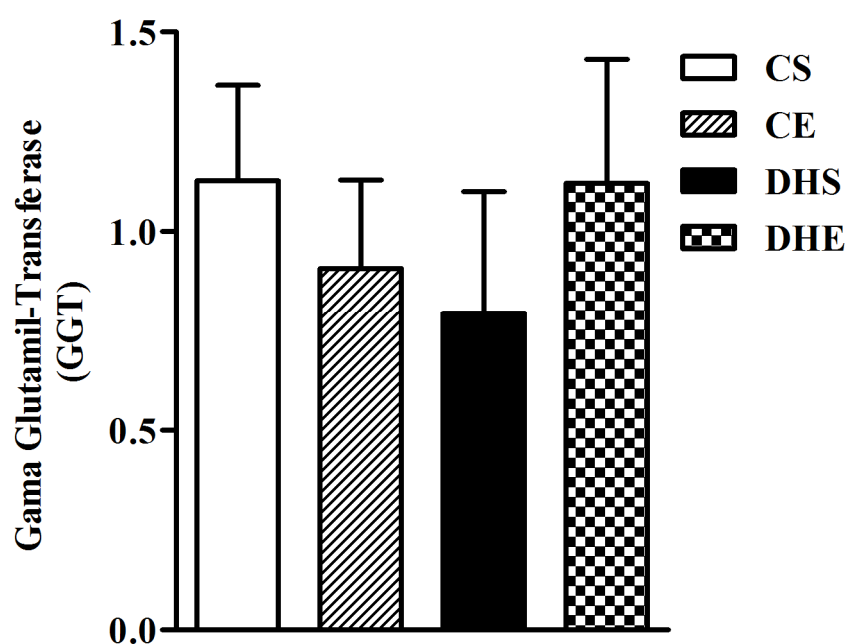


Figura 11. Dosagem da enzima hepática Gama-glutamil Transferase (GGT) do plasma de ratos. Valores são médias \pm erro padrão da média. CS=Controle Sedentário; CE=Controle Exercício; DHS=Dieta Hiperlipídica Sedentário; DHE=Dieta Hiperlipídica Exercício.

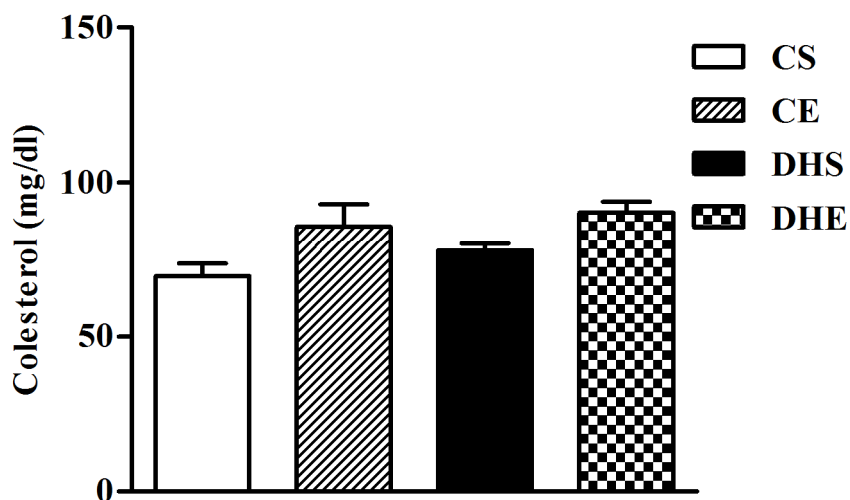


Figura 12. Dosagem de colesterol (mg/dl) do plasma de ratos. Valores são médias \pm erro padrão da média. CS=Controle Sedentário; CE=Controle Exercício; DHS=Dieta Hiperlipídica Sedentário; DHE=Dieta Hiperlipídica Exercício.

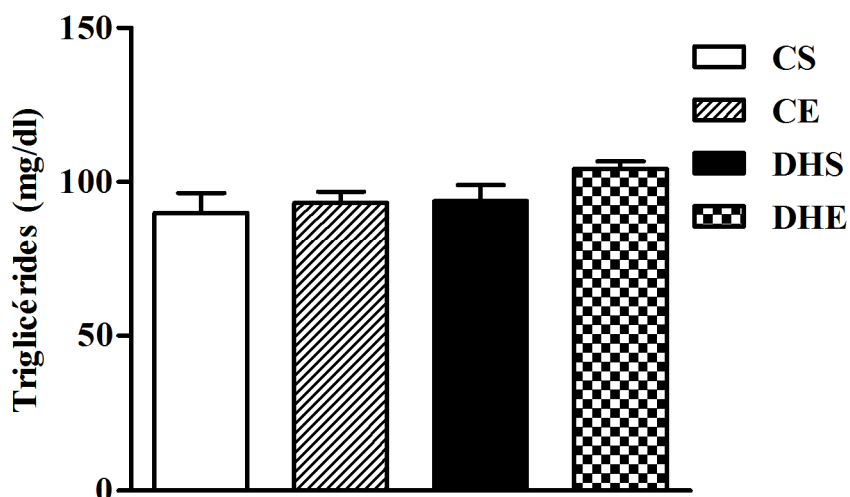


Figura 13. Dosagem de Triglicérides (mg/dl) do plasma de ratos. Valores são médias \pm erro padrão da média. CS=Controle Sedentário; CE=Controle Exercício; DHS=Dieta Hiperlipídica Sedentário; DHE=Dieta Hiperlipídica Exercício.

4.4 Quantificação da expressão do RNAm de activina β A e folistatina no fígado

O treinamento associou-se significativamente a expressão de activina β A no grupo DHE comparado com o grupo DHS e diminuiu significativamente a expressão de folistatina no grupo que recebeu dieta padrão (CE) comparado com o grupo sedentário (CS) e no grupo

que recebeu dieta hiperlipídica (DHE) comparado com seu grupo sedentário (DHS) (Figura 14).

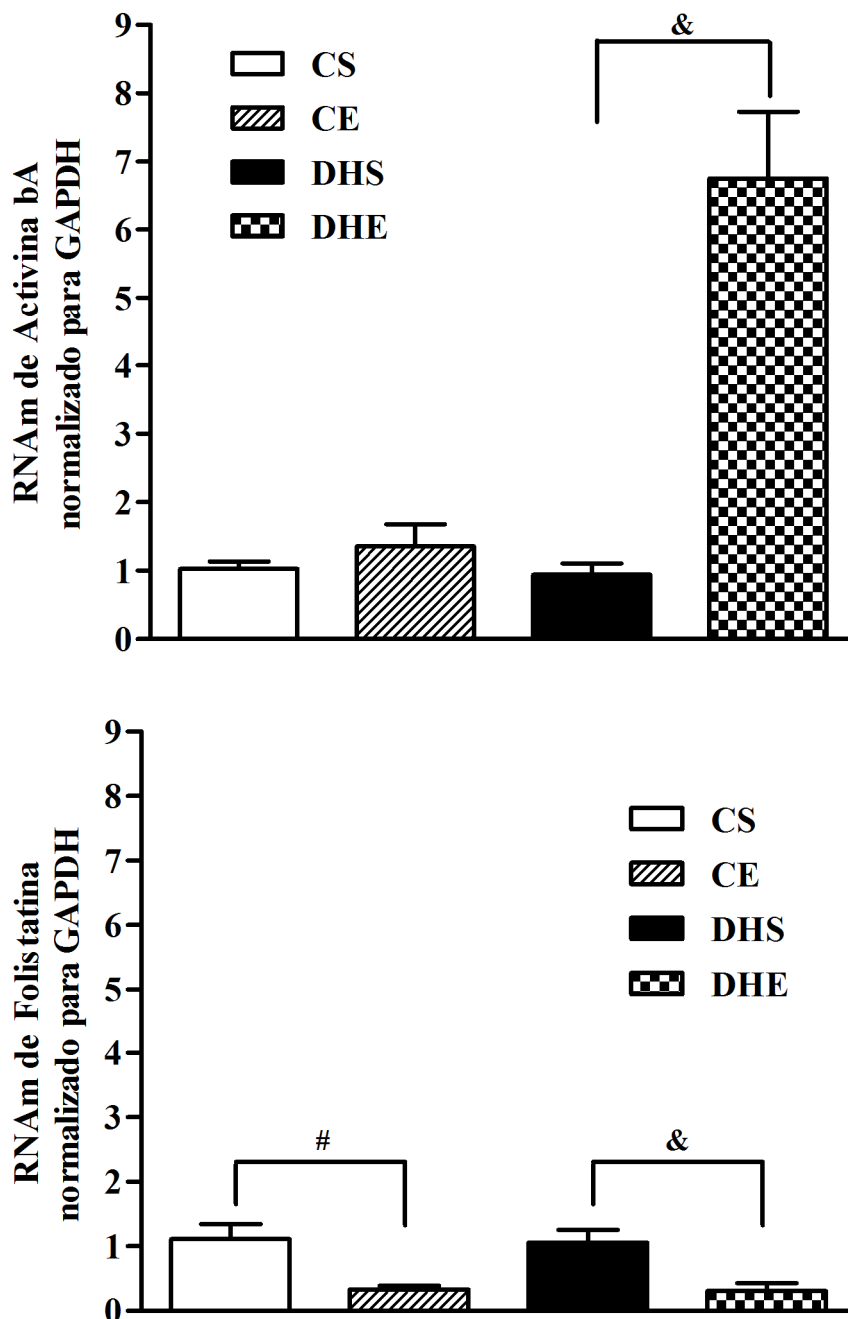


Figura 14. Expressão de RNAm de Activina β A e Folistatina no fígado de ratos. Valores são médias \pm erro padrão da média. CS=Grupo controle sedentário; CE=Grupo controle exercício; DHS=Grupo dieta hiperlipídica sedentário; DHE=Grupo dieta hiperlipídica exercício. $P < 0.05$, * CS vs DHS; # CS vs CE; & DHS vs DHE.

4.5 Alterações morfológicas

O acúmulo de gordura hepática variou significativamente entre os grupos. Não houve evidência de esteatose ou inflamação (grau 0) nos grupos dieta padrão sedentário e exercício. Por outro lado, nos ratos alimentados por dieta hiperlipídica o grau de esteatose variou do grau 1 ao grau 3, não estando associada com inflamação ou fibrose. Após o período de treinamento, o grupo DHE mostrou uma melhora na extensão da infiltração gordurosa hepática com o grau de esteatose variando de 0 a 1 (Figura 15) (Tabela III).

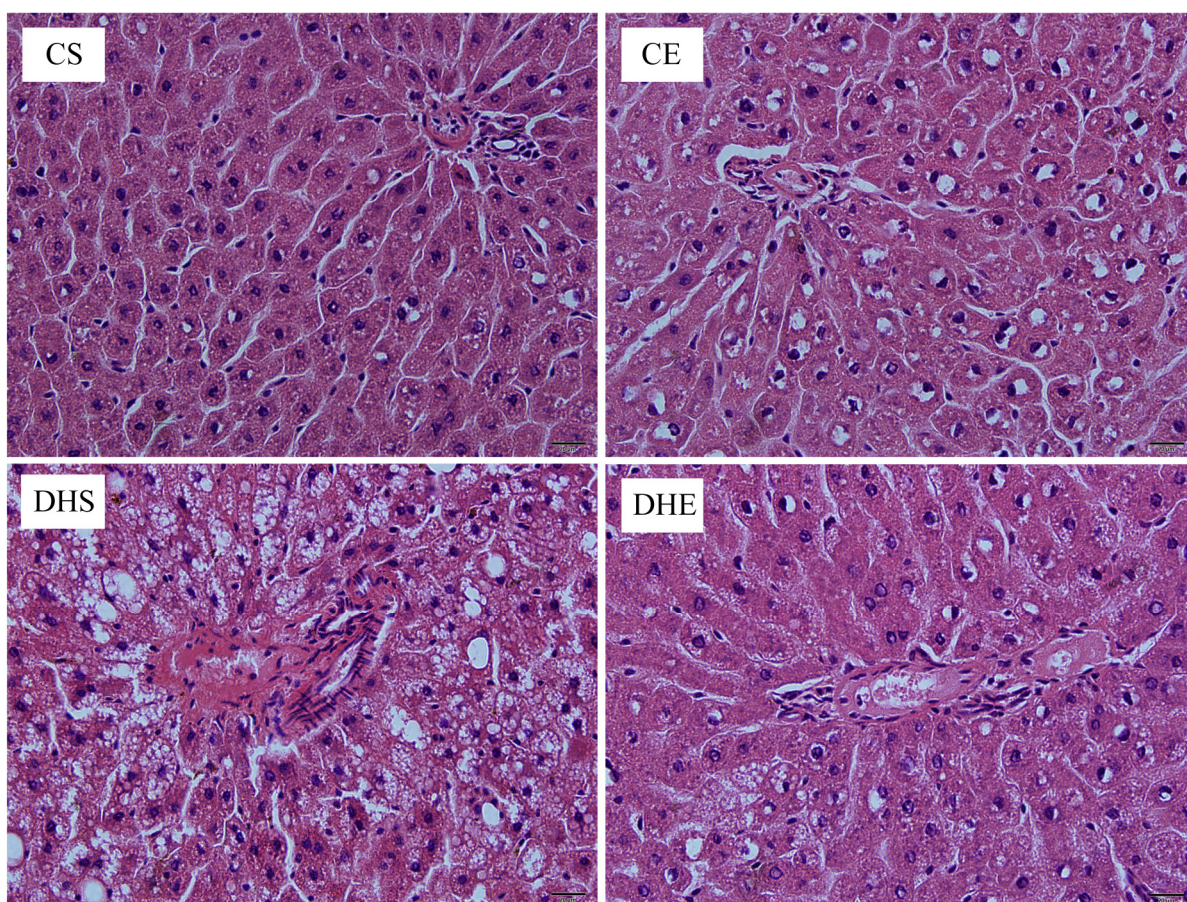


Figura 15. Análise histológica do fígado de ratos alimentados por dieta padrão e dieta hiperlipídica. Figuras microscópicas originais representativas de cortes corados com hematoxilina-eosina (Barra = 20 μ m). CS=Grupo controle sedentário; CE=Grupo controle exercício; DHS=Grupo dieta hiperlipídica sedentário; DHE=Grupo dieta hiperlipídica exercício.

Tabela III. Análise do grau de esteatose hepática

Esteatose	CE	CS	DHE	DHS	Total
0	6(22.22)	6(22.22)	3(11.11)	0(0.00)	15(55.56)
1	0(0.00)	0(0.00)	3(11.11)	1(3.70)	4(14.81)
2	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	5(18.52)	5(18.52)
3	0(0.00)	0(0.00)	2(7.41)	1(3.70)	3(11.11)
Total	6(22.22)	6(22.22)	8(29.63)	7(25.93)	27(100.00)

p-valor < 0,01 (referente ao teste exato de Fisher)

5. DISCUSSÃO

Os resultados indicam que o exercício físico reduz os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica no fígado e associa-se a modificação da expressão hepática da subunidade β A da actvina e da folistatina neste modelo de DHGNA em ratos.

Os animais alimentados com dieta hiperlipídica tiveram um aumento significativo no ganho de massa corporal corroborando com os estudos de Estadella *et al* (2004), Sene-Fiorese *et al* (2008), Schultz *et al* (2010) e Bueno *et al* (2011). Pesquisadores observaram aumento dos níveis circulantes de leptina e diminuição da sensibilidade à leptina em animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica (Widdowson *et al*, 1997; Estadella *et al*, 2004). Este fato pode estar parcialmente relacionado com a redução do gasto energético após ingestão de alto teor de gordura, contribuindo para o ganho de massa corporal.

A obesidade induzida por dieta hiperlipídica foi acompanhada por diminuição da tolerância à glicose como previamente descrito (Chalkley *et al*, 2002; Woods *et al*, 2003). O treinamento diminuiu a resistência à insulina no grupo dos animais alimentados com dieta hiperlipídica. É bem estabelecido que o exercício físico está ligado ao aumento da sensibilidade à insulina em animais obesos, induzida por dieta, pela ativação de componentes da cascata de sinalização da insulina no músculo esquelético e no fígado (Yaspelkis *et al*, 2007; Pauli *et al*, 2008; De Souza *et al*, 2010). Entretanto, é importante considerar a intensidade, frequência e duração do exercício. Estudos têm mostrado que o exercício aeróbico moderado promove redução do peso corporal e adiposidade, melhorando o perfil lipídico e atenuando a esteatose hepática induzida por dieta (Estadella *et al*, 2004; He *et al*, 2008; Sene-Fiorese *et al*, 2008; Marques *et al*, 2010; Schultz *et al*, 2010).

Com relação às enzimas hepáticas, observou-se que o exercício físico contribuiu na diminuição dos níveis plasmáticos de ALT nos animais alimentados por dieta hiperlipídica

comparado com os animais sedentários. Tanto no estudo de Ahmed *et al* (2009) quanto no de Lieber *et al* (2004) não foi observado aumento significativo dos níveis de ALT nos animais alimentados por dieta hiperlipídica. Nosso estudo não mostrou diferenças significativas nas enzimas AST e GGT, porém observou-se alteração da enzima ALT. Os níveis normais de ALT não excluem a possibilidade de o indivíduo ter lesão grave no fígado, sendo necessária biópsia para detectar a presença de lesão (Amarapurkar & Patel, 2004). Características histológicas de DHGNA podem estar presentes em indivíduos com valores normais de ALT, sendo assim a histologia hepática destes indivíduos pode não ser muito diferente daqueles com níveis elevados de ALT, por outro lado, valores elevados de ALT não são indicadores confiáveis da presença de esteatohepatite (Mofrad *et al*, 2003).

No presente trabalho, utilizamos um modelo animal de DHGNA (Lieber *et al*, 2004; London & George, 2007; Ahmed *et al*, 2009). A DHGNA é um distúrbio complexo que tem como principal processo patológico inicial o acúmulo de gordura dentro dos hepatócitos. Acredita-se que esta doença resulta de um desequilíbrio entre a síntese hepática de ácidos graxos e a oxidação (London & George, 2007; Yndestad *et al*, 2011). Para descrever os achados histológicos neste modelo, usamos o sistema de escore histológico validado por Kleiner *et al* (2005). Esta proposta de escore foi baseada em um sistema para avaliação semi-quantitativa de lesões unicamente reconhecidas em EHNA (Brunt *et al*, 1999). No sistema de escore proposto por Kleiner *et al* (2005), as várias lesões histológicas da DHGNA foram avaliadas e somadas para fornecer um escore de atividade histológica da DHGNA indo numa escala de 0-8, analisando uma série de características histológicas desta doença, incluindo presença de inflamação e fibrose. No entanto, difere de outros métodos que dependem mais de uma avaliação global de gravidade (Brunt *et al*, 1999) ou de categorizar doenças (Younossi *et al*, 1998). Atualmente, a biópsia do fígado é o método *golden standard* para confirmar ou

excluir o diagnóstico de DHGNA e EHNA (Tiniakos, 2010). Os resultados mostraram que a dieta hiperlipídica associou-se ao acúmulo de gordura no fígado em diferentes graus, porém não foi observada inflamação ou fibrose neste modelo. Entretanto, o estudo de He *et al* (2008), observou a presença de esteatose hepática e manifestações histológicas características da EHNA, como inflamação e focos de necrose. Além disso, foi observada a presença de fatores patogênicos, TNF- α e produtos de peroxidação lipídica pelo aumento do estresse oxidativo, que de acordo com Lieber *et al* (2004) tem correlação positiva com EHNA. O modelo experimental utilizado por He *et al* (2008) é similar ao apresentado no presente estudo. No entanto, estas diferenças encontradas na histologia hepática devem-se provavelmente, às diferentes espécies de animais utilizados e/ou outros fatores ambientais. Estudos recentes avaliaram características histológicas utilizando o mesmo modelo animal, porém observaram apenas a densidade de volume da esteatose hepática, mostrando acúmulo de gordura no fígado de animais alimentados por dieta hiperlipídica (Marques et al, 2010; Schultz et al, 2010).

Nossos resultados demonstraram que o treinamento de natação minimizou os danos ao tecido hepático causado pela dieta hiperlipídica, como descrito por Gauthier *et al* (2004), Lavoie *et al* (2006), He *et al* (2008), Sene-Fiorese *et al* (2008), Schultz *et al* (2010). Os efeitos metabólicos benéficos do exercício têm sido atribuídos ao aumento da sensibilidade à insulina, a oxidação de gordura e à diminuição da síntese de lipídios no fígado pela ativação da via *AMP-activated protein kinase* (AMPK) (Carlson & Winder, 1999; Park et al, 2002; Lavoie et al, 2006; Schultz et al, 2010). No presente estudo, observou-se perda de peso no grupo dos animais alimentados por dieta hiperlipídica e exercitados. O acúmulo de gordura intra-abdominal está associado à resistência insulínica adquirida nos adipócitos, podendo ser responsável pelo prejuízo da ação anti-lipolítica da insulina, contribuindo no aumento do

fluxo de ácidos graxos para o fígado (Laws, 1996; Utzschneider & Kahn, 2006). Entretanto, mecanicamente, a patogênese da DHGNA é incompreendida.

A expressão do RNAm de activina A e folistatina variou reciprocamente nos animais alimentados por dieta hiperlipídica exercício e sedentário, sugerindo uma regulação adaptativa local para promover um aumento no efeito biológico da activina A. A activina A foi previamente relacionada com a patogênese de doenças hepáticas, incluindo DHGNA, dentre estes efeitos estão, apoptose e inibição do crescimento de hepatócitos, aumento da síntese de colágeno nos hepatócitos, distúrbios no metabolismo de lipídios e glicose (Yasuda et al, 1993; Takabe et al, 2003; Gold et al, 2005; Rodgarkia-Dara et al, 2006; Werner & Alzheimer, 2006; Deli et al, 2008; Yndestad et al, 2009; Yndestad et al, 2011). Contudo, mostramos pela primeira vez que activina e folistatina podem estar envolvidas no efeito benéfico exercido pelo exercício sobre DHGNA. A folistatina é uma proteína ligante que age extracelularmente se ligando a activina e inibindo sua ação (Shimonaka et al, 1991). O eixo activina/folistatina representa um complexo circuito que tem função autócrina/parácrina local e ao mesmo tempo podem ser auto-modulados (Leal et al, 2003; Bilezikjian et al, 2004). Muitos estudos têm descrito potenciais mecanismos que poderiam explicar o papel do eixo activina/folistatina na adaptação do fígado induzida pelo exercício. A este respeito, estudos mostram que as activinas A, E e provavelmente C estão associadas com produção de insulina e sensibilidade à insulina, bem como, com a oxidação de gordura no fígado e outros tecidos (Mine et al, 1989; Mine et al, 1996; Yndestad et al, 2009; Hashimoto & Funaba, 2011). Além disso, tem sido demonstrado que a activina A age como uma citocina anti-inflamatória (Jones et al, 2007; Cuschieri et al, 2008), além de induzir proteínas pró- e anti-inflamatórias (Phillips et al, 2001). A inflamação é um importante mecanismo envolvido tanto na resistência à insulina quanto na DHGNA (Schenk et al, 2008; Hashimoto et al, 2011). O estudo de Weigert *et al*

(2009), mostra que a adiponectina aumenta a expressão de RNAm de activina A em monócitos. Os níveis de adiponectina, geralmente, são menores em casos de resistência a insulina e inflamação e maiores em casos de perda de peso corporal e/ou exercício físico (Palomer et al, 2005; Kadowaki et al, 2006). Schultz *et al* (2010), mostrou um aumento da expressão de adiponectina no tecido adiposo de camundongos submetidos ao exercício de natação. Outros estudos relatam que a adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, mediados pelo aumento da oxidação de gordura nestes tecidos (Chang et al, 2006; Bauche et al, 2007; Aygun et al, 2008). Portanto, a activina A pode estar ligada ao exercício por intermédio da adiponectina.

Recentemente foi mostrado que o exercício induz um aumento na folistatina plasmática, sugerindo que a folistatina pode ser uma “hepatocina” estimulada pela contração muscular (Hansen et al, 2011).

Contudo, embora o exercício físico tenha influenciado na expressão da Activina A e Folistatina no fígado, não se sabe a relação exata do exercício com estas proteínas.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que o exercício físico associou-se à redução dos efeitos deletérios da dieta hiperlipídica no fígado diminuindo a deposição hepática de gordura em ratos obesos e resistentes à insulina e sugere que a expressão local de activina-folistatina pode estar envolvida nesse mecanismo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, U.; REDGRAVE, T. G.; OATES, P. S. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, n. 8, p. 1463-1471, 2009

AMARAPURKAR, D. N.; PATEL, N. D. Clinical spectrum and natural history of non-alcoholic steatohepatitis with normal alanine aminotransferase values. **Trop Gastroenterol**, v. 25, n. 3, p. 130-134, 2004

AYGUN, C.; KOCAMAN, O.; SENTURK, O. Adiponectin: is it a novel treatment modality to alleviate liver injury in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)? **Med Hypotheses**, v. 70, n. 2, p. 457-458, 2008

BAUCHE, I. B.; EL MKADEM, S. A.; POTTIER, A. M.; SENOU, M.; MANY, M. C.; REZSOHAZY, R.; PENICAUD, L.; MAEDA, N.; FUNAHASHI, T.; BRICHARD, S. M. Overexpression of adiponectin targeted to adipose tissue in transgenic mice: impaired adipocyte differentiation. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1539-1549, 2007

BELLENTANI, S.; SACCOCCIO, G.; MASUTTI, F.; CROCÈ, L. S.; BRANDI, G.; SASSO, F.; CRISTANINI, G.; TIRIBELLI, C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. **Ann Intern Med**, v. 132, n. 2, p. 112-117, 2000

BERGASA, N. V.; MEHLMAN, J.; BIR, K. Aerobic exercise: a potential therapeutic intervention for patients with liver disease. **Med Hypotheses**, v. 62, n. 6, p. 935-941, 2004

BERSON, A.; DE BECO, V.; LETTÉRON, P.; ROBIN, M. A.; MOREAU, C.; EL KAHWAJI, J.; VERTHIER, N.; FELDMANN, G.; FROMENTY, B.; PESSAYRE, D. Steatohepatitis-Inducing Drugs Cause Mitochondrial Dysfunction and Lipid Peroxidation in Rat Hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 764-774, 1998

BILEZIKJIAN, L. M.; BLOUNT, A. L.; LEAL, A. M.; DONALDSON, C. J.; FISCHER, W. H.; VALE, W. W. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. **Mol Cell Endocrinol**, v. 225, n. 1-2, p. 29-36, 2004

BJÖRNSSON, E.; ÂNGULO, P. Non-alcoholic fatty liver disease. **Scand J Gastroenterol**, v.42, n. 9, p. 1023-1030, 2007

BRUNT, E. M.; JANNEY, C. G.; DI BISCEGLIE, A. M.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; BACON, B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 9, p. 2467-2474, 1999

BRUNT, E. M. Nonalcoholic Steatohepatitis: Definition and Pathology. **Semin Liver Dis**, v. 21, n. 1, p. 3-16, 2001

BUENO, P. G.; BASSI, D.; CONTRERA, D. G.; CARNIELLI, H. M.; SILVA, R. N.; NONAKA, K. O.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; LEAL, A. M. Post-exercise changes in myostatin and actRIIB expression in obese insulin-resistant rats. **Mol Cell Endocrinol. Mol Cell Endocrinol**, v. 339, n. 1-2, p. 159-164, 2011

CARLSON, C. L.; WINDER, W. W. Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. **J Appl Physiol**, v. 86, n. 2, p. 669-674, 1999

CHABICOVSKY, M.; HERKNER, K.; ROSSMANITH, W. Overexpression of Activin β C or Activin β E in the Mouse Liver Inhibits Regenerative Deoxyribonucleic Acid Synthesis of Hepatic Cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3497-3504, 2003

CHALKLEY, S. M.; HETTIARACHCHI, M.; CHISHOLM, D. J.; KRAEGEN, E. W. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 282, n. 6, p. 1231-1238, 2002

CHANG, S. P.; CHEN, Y. H.; CHANG, W. C.; LIU, I. M.; CHENG, J. T. Increase of adiponectin receptor gene expression by physical exercise in soleus muscle of obese Zucker rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 97, n. 2, p. 189-195, 2006

COLBERG, S. R.; ALBRIGHT, A. L.; BLISSMER, B. J.; BRAUN, B.; CHASAN-TABER, L.; FERNHALL, B.; REGENSTEINER, J. G.; RUBIN, R. R.; SIGAL, R. J. Exercise and type

2 diabetes: American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. Exercise and type 2 diabetes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 12, p. 2282-2303, 2010

CUSCHIERI, J.; BULGER, E.; GRINSELL, R.; GARCIA, I.; MAIER, R. V. Insulin regulates macrophage activation through activin A. **Shock**, v. 29, n. 2, p. 285-290, 2008

DAY, C. P.; JAMES, O. F. W. Steatohepatitis: A Tale of Two “Hits”? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998

DE SOUZA, C. T.; FREDERICO, M. J.; DA LUZ, G.; CINTRA, D. E.; ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; VELLOSO, L. A. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo 1/HNF-4 alpha pathway in insulin resistant mice. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 12, p. 2239-2253, 2010

DELI, A.; KREIDL, E.; SANTIFALLER, S.; TROTTER, B.; SEIR, K.; BERGER, W.; SCHULTE-HERMANN, R.; RODGARKIA-DARA, C.; GRUSCH, M. Activins and activin antagonists in hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol.**, v. 14, n. 11, p. 1699-1709, 2008

DENG, Q. G.; SHE, H.; CHENG, J. H.; FRENCH, S. W.; KOOP, D. R.; XIONG, S.; TSUKAMOTO, H. Steatohepatitis Induced by Intragastric Overfeeding in Mice. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 905-914, 2005

DUTRA, D. B.; BUENO, P. G.; SILVA, R. N.; NAKAHARA, N. H.; SELISTRE-ARAÚJO, H. S.; NONAKA, K. O.; LEAL, A. M. Expression of myostatin, myostatin receptors and follistatin in diabetic rats submitted to exercise. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, doi: 10.1111/j.1440-1681.2012.05690.x, 2012

ESTADELLA, D.; OYAMA, L. M.; DÂMASO, A. R.; RIBEIRO, E. B.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218-224, 2004

FALCK-YTTER, Y.; YOUNOSSI, Z. M.; MARCHESINI, G.; McCULLOUGH, A. J. Clinical Features and Natural History of Nonalcoholic Steatosis Syndromes. **Semin Liver Dis**, v. 21, n. 1, p. 17-26, 2001

FERREIRA, M. C.; CAVALLO, I. K.; FLORIO, P.; PETRAGLIA, F.; REIS, F. M. Activin betaA subunit, follistatin and follistatin-like 3 are expressed in the endometrium of ovariectomized rats and regulated by estrogen replacement. **J Mol Histol**, v. 39, n. 5, p. 535-541, 2008

FONG, D. G.; NEHRA, V.; LINDOR, K. D.; BUCHMAN, A. L. Metabolic and Nutritional Considerations in Nonalcoholic Fatty Liver. **Hepatology**, v. 32, n. 1, p. 3-10, 2000

FUJIWARA, Y.; HIROYAMA, M.; SANBE, A.; AOYAGI, T.; BIRUMACHI, J.; YAMAUCHI, J.; TSUJIMOTO, G.; TANOUE, A. Insulin hypersensitivity in mice lacking the V1b vasopressin receptor. **J Physiol**, v. 584, n. Pt 1, p. 235-244, 2007.

GAUTHIER, M. S.; COUTURIER, K.; CHARBONNEAU, A.; LAVOIE, J. M. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28, n. 8, p. 1064-1071, 2004

GOLD, E. J.; FRANCIS, R. J.; ZIMMERMANN, A.; MELLOR, S. L.; CRANFIELD, M.; RISBRIDGER, G. P.; GROOME, N. P.; WHEATLEY, A. M.; FLEMING, J. S. Changes in activin and activin receptor subunit expression in rat liver during the development of CCL4-induced cirrhosis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 201, n. 1-2, p. 143-153, 2003

GOLD, E. J.; ZHANG, X.; WHEATLEY, A. M.; MELLOR, S. L.; CRANFIELD, M.; RISBRIDGER, G. P.; GROOME, N. P.; FLEMING, J. S. β A- and β C-activin, follistatin, activin receptor mRNA and β C-activin peptide expression during rat liver regeneration. **J Mol Endocrinol**, v. 34, n. 2, p. 505-515, 2005

GUIDORIZZI DE SIQUEIRA, A. C.; COTRIM, H. P.; ROCHA, R.; CARVALHO, F. M.; DE FREITAS, L. A.; BARRETO, D.; GOUVEIA, L.; LANDEIRO, L. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: importance of risk factors and histological spectrum. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 8, p. 837-841, 2005

HANSEN, J.; BRANDT, C.; NIELSEN, A. R.; HOJMAN, P.; WHITHAM, M.; FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K.; PLOMGAARD, P. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. **Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 164-171, 2011

HASHIMOTO, O.; SEKIYAMA, K.; MATSUO, T.; HASEGAWA, Y. Implication of activin E in glucose metabolism: Transcriptional regulation of the inhibin/activin β E subunit gene in the liver. **Life Sci**, v. 85, n. 13-14, p. 534-540, 2009

HASHIMOTO, O.; FUNABA, M. Activin in glucose metabolism. **Vitam Horm**, v. 85, p. 217-234, 2011

HE, Y.; ZHANG, H.; FU, F. The effects of swimming exercise on high-fat-diet-induced steatohepatitis. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 48, n. 2, p. 259-265, 2008

HILDEN, M.; CHRISTOFFERSEN, P.; JUHL, E.; DALGAARD, J. B. Liver histology in a 'normal' population -examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. **Scand J Gastroenterol**, v. 12, n. 5, p. 593-597, 1977

JONES, K. L.; MANSELL, A.; PATELLA, S.; SCOTT, B. J.; HEDGER, M. P.; DE KRETZER, D. M.; PHILLIPS, D. J. Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 41, p. 16239-16244, 2007

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N.; HARA, K.; UEKI, K.; TOBE, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1784-1792, 2006

KIRÁLY, M. A.; BATES, H. E.; YUE, J. T.; GOCHE-MONTES, D.; FEDIUC, S.; PARK, E.; MATTHEWS, S. G.; VRANIC, M.; RIDDELL, M. C. Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker Diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. **Metabolism**, v. 56, n. 6, p. 732-744, 2007.

KLEINER, D. E.; BRUNT, E. M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M. J.; CUMMINGS, O. W.; FERRELL, L. D.; LIU, Y. C.; TORBENSON, M. S.; UNALP-ARIDA, A.; YEH, M.; MCCULLOUGH, A. J.; SANYAL, A. J. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005

KNOBLER, H.; SCHATTNER, A.; ZHORNICKI, T.; MALNICK, S. D.; KETER, D.; SOKOLOVSKAYA, N.; LURIE, Y.; BASS, D. D. Fatty liver—an additional and treatable feature of the insulin resistance syndrome. **Q J Med**, v. 92, n. 2, p. 73-79, 1999

LAVOIE, J. M.; GAUTHIER, M. S. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 12, p. 1393-1409, 2006

LAWS, A. Free fatty acids, insulin resistance and lipoprotein metabolism. **Curr Opin Lipidol**, v. 7, n. 3, p. 172-177, 1996

LEAL, A. M.; BLOUNT, A. L.; DONALDSON, C. J.; BILEZIKJIAN, L. M.; VALE, W. W. Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by the interactions of activin-A, dexamethasone and testosterone in anterior pituitary cell cultures of male rats. **Neuroendocrinology**, v. 77, n. 5, p. 298-304, 2003

LEME, J. A.; GOMES, R. J.; DE MELLO, M. A.; LUCIANO, E. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in the diabetics rats. **Growth Factors**, v. 25, n. 1, p. 9-14, 2007.

LIEBER, C. S.; LEO, M. A.; MAK, K. M.; XU, Y.; CAO, Q.; REN, C.; PONOMARENKO, A.; DECARLI, L. M. Model of nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 3, p. 502-509, 2004

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LONDON, R. M.; GEORGE, J. Pathogenesis of NASH: animal models. **Clin Liver Dis**, v. 11, n. 1, p. 55-74, 2007

LUDWIG, J.; VIGGIANO, T. R.; MCGILL, D. B.; OH, B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clin Proc**, v. 55, n. 7, p. 434-438, 1980

MARCHESINI, G.; BRIZI, M.; MORSELLI-LABATE, A. M.; BIANCHI, G.; BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; FORLANI, G.; MELCHIONDA, N. Association of Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Insulin Resistance. **Am J Med.**, v. 107, n. 5, p. 450-455, 1999

MARQUES, C. M.; MOTTA, V. F.; TORRES, T. S.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 5, p. 467-475, 2010

MATTEONI, C. A.; YOUNOSSI, Z. M.; GRAMLICH, T.; BOPARAI, N.; LIU, Y. C.; MCCULLOUGH, A. J. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1413-1419, 1999

MATSAKAS, A.; FRIEDEL, A.; HERTRAMPF, T.; DIEL, P. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. **Acta Physiol Scand**, v.183, n. 3, p. 299-307, 2005.

MATSAKAS, A.; BOZZO, C.; CACCIANI, N.; CALIARO, F.; REGGIANI, C.; MASCARELLO, F.; PATRUNO, M. Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. **Exp Physiol**, v. 91, n. 6, p. 983-994, 2006.

MICHALANY, J. **Técnica histological em anatomia patológica**: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 3^a Ed. São Paulo: Michalany, 1998

MINE, T.; KOJIMA, I.; OGATA, E. Stimulation of glucose production by activin-A in isolated rat hepatocytes. **Endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 586-591, 1989

MINE, T.; YASUDA, H.; FUJITA, T.; HASEGAWA, Y. Effects of inhibin on activin A-induced glucose metabolism in rat hepatocytes. **Endocrine**, v. 5, n. 1, p. 41-46, 1996

MOFRAD, P.; CONTOS, M. J.; HAQUE, M.; SARGEANT, C.; FISHER, R. A.; LUKETIC, V. A.; STERLING, R. K.; SHIFFMAN, M. L.; STRAVITZ, R. T.; SANYAL, A. J. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. **Hepatology**, v. 37, n. 6, p. 1286-1292, 2003

O'DONOVAN, G.; KEARNEY, E. M.; NEVILL, A. M.; WOOLF-MAY, K.; BIRD, S. R. The effects of 24 weeks of moderate- or high-intensity exercise on insulin resistance. **Eur J Appl Physiol**, v. 95, n. 5-6, p. 522-528, 2005

PALOMER, X.; PÉREZ, A.; BLANCO-VACA, F. Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease. **Med Clin (Barc)**, v. 124, n. 10, p. 388-395, 2005

PARK, H.; KAUSHIK, V. K.; CONSTANT, S.; PRENTKI, M.; PRZYBYTKOWSKI, E.; RUDERMAN, N. B.; SAHA, A. K. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. **J Biol Chem**, v. 277, n. 36, p. 32571-32577, 2002

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; CARVALHO-FILHO, M. A.; MORAES, J. C.; DE SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **J Physiol**, v. 586, n. 2, p. 659-671, 2008

PHILLIPS, D. J.; JONES, K. L.; SCHEERLINCK, J. Y.; HEDGER, M. P.; DE KRETZER, D. M. Evidence for activin A and follistatin involvement in the systemic inflammatory response. **Mol Cell Endocrinol**, v. 180, n. 1-2, p. 155-162, 2001

RAMOS, E. J.; XU, Y.; ROMANOVA, I.; MIDDLETON, F.; CHEN, C.; QUINN, R.; INUI, A.; DAS, U.; MEGUID, M. M. Is obesity an inflammatory disease? **Surgery**, v. 134, n. 2, p. 329-335, 2003

RODGARKIA-DARA, C.; VEJDA, S.; ERLACH, N.; LOSERT, A.; BURSCH, W.; BERGER, W.; SCHULTE-HERMANN, R.; GRUSCH, M. The activin axis in liver biology and disease. **Mutat Res**, v. 613, n. 2-3, p. 123-137, 2006

SAAD, M. J.; CARVALHO, C. R.; THIRONE, A. C.; VELLOSO, L. A. Insulin Induces Tyrosine Phosphorylation of JAK2 in Insulin-sensitive Tissues of the Intact Rat. **J Biol Chem**, v. 271, n. 36, p. 22100-22104, 1996

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

SARIS, W. H.; BLAIR, S. N.; VAN BAAK, M. A.; EATON, S. B.; DAVIES, P. S.; DI PIETRO, L.; FOGELHOLM, M.; RISSANEN, A.; SCHOELLER, D.; SWINBURN, B.; TREMBLAY, A.; WESTERTERP, K. R.; WYATT, H. How much physical activity is enough to prevent unhealthy weight gain? Outcome of the IASO 1st Stock Conference and consensus statement. **Obes Rev**, v. 4, n. 2, p. 101-114, 2003

SENE-FIORESE, M.; DUARTE, F. O.; SCARMAGNANI, F. R.; CHEIK, N.C.; MANZONI, M. S.; NONAKA, K. O.; ROSSI, E.; DE OLIVEIRA DUARTE, A. C.; DÂMASO, A. R. Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 10, p. 2217-2222, 2008

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J Clin Invest**, v. 118, n. 9, p. 2992-3002, 2008

SCHULTZ, A.; MENDONCA, L. S.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. **Exp Toxicol Pathol**, doi:10.1016/j.etp.2010.08.019, 2010

SHIMONAKA, M.; INOUE, S.; SHIMASAKI, S.; LING, N. Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit. **Endocrinology**, v. 128, n. 6, p. 3313-3315, 1991

SMITH, B. W.; ADAMS, L. A. Non-alcoholic fatty liver disease. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v.48, n. 3, p. 97-113, 2011

TAKABE, K.; WANG, L.; LEAL, A. M.; MACCONELL, L. A.; WIATER, E.; TOMIYA, T.; OHNO, A.; VERMA, I. M.; VALE, W. Adenovirus-Mediated Overexpression of Follistatin Enlarges Intact Liver of Adult Rats. **Hepatology**, v. 38, n. 5, p. 1107-1115, 2003

TE SLIGTE, K.; BOURASS, I.; SELS, J. P.; DRIESSEN, A.; STOCKBRUGGER, R. W.; KOEK, G. H. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. **Eur J Intern Med**, v. 15, n. 1, p. 10-21, 2004

TINIAKOS, D. G. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 6, p. 643-650, 2010

UTZSCHNEIDER, K. M.; KAHN, S. E. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 12, p. 4753-4761, 2006

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 11, p. 1389-1394, 2002.

WEIGERT, J.; NEUMEIER, M.; WANNINGER, J.; SCHOBER, F.; SPORRER, D.; WEBER, M.; SCHRAMM, A.; WURM, S.; STÖGBAUER, F.; FILARSKY, M.; SCHÄFFLER, A.; ASLANIDIS, C.; SCHÖLMERICH, J.; BUECHLER, C. Adiponectin upregulates monocytic activin A but systemic levels are not altered in obesity or type 2 diabetes. **Cytokine**, v. 45, n. 2, p. 86-91, 2009

WERNER, S.; ALZHEIMER, C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 3, p. 157-171, 2006

WIDDOWSON, P. S.; UPTON, R.; BUCKINGHAM, R.; ARCH, J.; WILLIAMS, G. Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 46, n. 11, p. 1782-1785, 1997

WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; RUSHING, P. A.; D'ALESSIO, D.; TSO, P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rat. **J Nutr**, v. 133, n. 4, p. 1081-1087, 2003

YASPELKIS, B. B. 3RD.; LESSARD, S. J.; REEDER, D. W.; LIMON, J. J.; SAITO, M.; RIVAS, D. A.; KVASHA, I.; HAWLEY, J. A. Exercise reverses high-fat diet induced impairments on compartmentalization and activation of components of the insulin-signaling cascade in skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 4, p. 941-949, 2007

YASUDA, H.; MINE, T.; SHIBATA, H.; ETO, Y.; HASEGAWA, Y.; TAKEUCHI, T.; ASANO, S.; KOJIMA, I. Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. **J Clin Invest**, v. 92, n. 3, p. 1491-1496, 1993

YNDESTAD, A.; HAUKELAND, J. W.; DAHL, T. B.; BJØRO, K.; GLADHAUG, I. P.; BERGE, C.; DAMÁS, J. K.; HAALAND, T.; LØBERG, E. M.; LINNESTAD, P.; BIRKELAND, K.; KONOPSKI, Z.; HALVORSEN, B.; BERGE, R. K.; AUKRUST, P. A Complex Role of Activin A in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Am J Gastroenterol**, v. 104, n. 9, p. 2196-2205, 2009

YNDESTAD, A.; HAUKELAND, J. W.; DAHL, T. B.; HALVORSEN, B.; AUKRUST, P. Activin A in nonalcoholic fatty liver disease. **Vitam Horm**, v. 85, p. 323-342, 2011

YOUNOSSI, Z. M.; GRAMLICH, T.; LIU, Y. C.; MATTEONI, C.; PETRELLI, M.; GOLDBLUM, J.; RYBICKI, L.; MCCULLOUGH, A. J. Nonalcoholic fatty liver disease: assessment of variability in pathologic interpretations. **Mod Pathol**, v. 11, n. 6, p. 560-565, 1998

ANEXO

1 **Impact of exercise on liver expression of activin A and follistatin in a nonalcoholic fatty liver**
2 **disease model in rats**

3 Silva RN¹, Bueno PG², Avó LRS³, Nonaka KO², Selistre-Araújo HS², Leal AMO³

4 ¹Departments of Physical Therapy, ²Physiological Sciences and ³Medicine of Federal University of
5 São Carlos, São Carlos-SP, Brazil.

6

7 Corresponding author:

8 Ângela M. O. Leal

9 Department of Medicine

10 Telephone: + 55 16 3351-8340

11 Federal University of São Carlos

12 Rod. Washington Luís, km 235

13 CEP 13.565-905

14 São Carlos – SP

15 angelaleal@ufscar.br

16

17 **Keywords:** Activin-follistatin, NAFLD, exercise

18 **Short title:** Activin and follistatin in NAFLD and exercise

19

20 **DISCLOSURE STATEMENT:** The authors have nothing to disclose.

21

22

23

24

25 Abstract

26 Nonalcoholic Fatty Liver disease (NAFLD) is characterized by fat accumulation in the liver and
27 associated with obesity and insulin resistance. Activin A is a member of the transforming growth
28 factor (TGF)- β superfamily and inhibits hepatocyte growth. Follistatin is a glycoprotein which
29 antagonizes the biological actions of activin. Exercise is an important therapeutic strategy to decrease
30 the metabolic effects of obesity. In this study, we evaluated the pattern of Activin A and follistatin
31 liver expression in obese rats submitted to swimming exercise. Adult rats were allowed free access to
32 standard rodent chow (C) or high-fat diet (HF) during 12 weeks. Then, C and HF rats were randomly
33 assigned to a swimming training group (C-Swim and HF-Swim) or a sedentary group (C-Sed and HF-
34 Sed). C-Swim and HF-Swim swam 5 day week⁻¹, for 4 weeks. Alanine transaminase (ALT) levels
35 were significantly higher in HF-Sed than in C-Sed and lower in HF-Swim than in HF-Sed. Activin β A
36 subunit mRNA was significantly higher in HF-Swim than in HF-Sed. Follistatin mRNA was
37 significantly lower in C-Swim and HF-Swim compared to C-Sed and HF-Sed, respectively. There was
38 no evidence of steatosis or inflammation in C. In contrast, in HF the severity of steatosis varied from
39 grade 1 to grade 3. HF-Swim showed improvement in the extent of liver parenchyma damage, the
40 severity of steatosis varying from grade 0 to grade 1. These data show that exercise may reduce the
41 deleterious effects of high-fat diet on liver and suggest that the local expression of activin-follistatin
42 may be involved.

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52 **Introduction**

53 Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common type of chronic liver disorder
54 and includes a broad spectrum of liver damage, ranging from simple steatosis to steatohepatitis
55 (NASH) and cirrhosis (1 – 4). Evaluation of these histopathologic characteristics is possible through a
56 liver biopsy (1, 4).

57 NAFLD is closely associated with obesity and increased lipolysis due to loss of insulin
58 sensitivity and impaired antilipolytic action of insulin, main factor responsible for the development of
59 hepatic steatosis (4 – 6).

60 Activins, members of the transforming growth factor (TGF)- β superfamily, are bioactive
61 dimeric proteins composed of two β subunits. Activin A, a homodimer composed of two β A subunits,
62 is involved in pathogenesis of a variety of inflammatory diseases ranging from rheumatoid arthritis,
63 inflammatory bowel disease and atherosclerosis, and also in several liver disorders, including NAFLD
64 and liver fibrosis (7 – 12). Activin A is considered a negative regulator of liver growth by inhibiting
65 the replication of hepatocytes and induction of apoptosis (7, 8). Activin biological actions are
66 counteracted by follistatin, a non-related glycoprotein which binds mature dimeric activin A with high
67 affinity and blocks activin signaling (7, 8, 10, 13). Follistatin, is associated with liver regeneration
68 after partial hepatectomy (14, 15, 16).

69 Activins signal transduction occurs through transmembrane serine/threonine kinase receptors.
70 Activin binds to the activin type II receptors (ActRII), transphosphorylates type I receptors (Activin
71 Receptor-Like kinase - ALKs 1 – 7) and forms the complex ActRII-IB/ (ALK) 4. This activated
72 activin receptor complex recruits the receptor-associated Smads which transmit the signals of activin
73 to the cell nucleus regulating transcription of target genes (8, 10, 12, 13).

74 Physical exercise is linked to improved glucose homeostasis and enhanced insulin sensitivity
75 and fundamental for prevention of type 2 diabetes and for the management of both type 1 and type 2
76 diabetes (17). It has been demonstrated that physical exercise has positive effects in the prevention and
77 attenuation of hepatic steatosis (18 – 22).

78 It has been demonstrated that serum levels of activin A and follistatin and activin A/follistatin
79 mRNA ratio in liver are increased in patients with NAFLD, potentially reflecting increased activin A
80 bioactivity. Activin A contributes to the pathogenesis of NAFLD inhibiting insulin sensitivity, glucose
81 and fatty acid metabolism. Activin A could also promote collagen III and TGF- β_1 expression and
82 matrix metalloproteinase (MMP) activity, as well as induce mitochondrial β -oxidation and
83 downregulate *de novo* FA synthesis (11, 13).

84 Studies show that follistatin can be modulated by exercise in muscle and fat tissue of diabetic
85 and obesity rats (23, 24). A recent report also demonstrates that plasma follistatin increases in
86 response to exercise originated most likely from the liver (25). However, there is no evidence of the
87 relationship between exercise and activin.

88 In the present study, we evaluated the pattern of Activin A and follistatin liver expression in
89 obese rats submitted to swimming exercise.

90

91 **Materials and Methods**

92 **Animals and experimental groups**

93 All procedures were approved by the Ethics Committee of the Federal University of São
94 Carlos. Male Wistar rats (190 ± 18.4 g) were acclimated in individual cages under controlled
95 temperature, humidity and lighting (12-h dark/light cycle) with free access to water and standard
96 rodent chow. After 7 days, animals were randomly assigned to 2 groups, control rats (C – n=15), fed
97 standard rodent chow, and high-fat diet rats (HF – n=15), fed 60% of Kcal as fat (Research Diets, New
98 Brunswick, NJ, USA). Animals and food intake were weighed daily. After 12 weeks, animals of both
99 groups were randomly divided into 2 groups, swimming training group (C-Swim and HF-Swim) or a
100 sedentary group (C-Sed and HF-Sed) with 6-7 rats/group.

101

102 **Exercise protocol**

103 Rats in the exercise groups (C-Swim and HF-Swim) were exercised by swimming for 1.5
104 h/day, 45min at 9:00 AM and 45 min at 05:00h PM, for 4 weeks. The swimming exercise was

105 performed in plastic barrels (30 cm diameter) filled with water (50 cm deep) maintained at 32–36°C
106 and with a weight of 5% body weight (BW) attached to the tail of each rat. The protocol started with
107 the animals swimming 30 min on the first day, gradually increasing so that in the fourth day they could
108 swim for 90 min. All animals were towel dried before returning to the cages. Sedentary groups were
109 placed in shallow water for 5 min, towel dried and then returned to their cages at the same time as
110 exercised groups. Both groups control and high-fat diet rats were able to carry out the exercise
111 protocol similarly.

112 After the training period, rats were sacrificed by decapitation, plasma was collected and stored
113 at -20°C and liver was dissected, weighed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C
114 until analysis.

115

116 **Glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests**

117 GTT was performed after the acclimation period and at 3, 4, 8 and 12 weeks of dietary
118 treatment and after exercise training, at the 16th week. After overnight fast, unanesthetized rats were
119 injected intraperitoneal (i.p.) with 1.5g of 50% glucose solution per kg of body weight (BW). Blood
120 samples were obtained from the tail vein before injection and at 30, 60, 90, and 120 min after glucose
121 injection. ITT was performed after the acclimation period and at 8 and 12 weeks of dietary treatment.
122 After overnight fast, unanesthetized rats were injected i.p. with human insulin 0.75U/kg BW. Blood
123 samples were obtained from the tail vein before injection and at 15, 30, 60, and 90 min after insulin
124 challenge. Blood glucose concentrations were measured by Accu-Check glucose meter (Roche
125 Diagnostic, Indianapolis, USA).

126

127 **Histological analysis**

128 Formalin-fixed and paraffin-embedded liver sections were stained with hematoxylin and eosin
129 (HE) and Masson's trichrome for histopathological examination. The severity of steatosis was graded
130 on the basis of the extent of parenchyma involved. Grade 0: < 5% of parenchyma is involved; Grade 1:
131 5 to 33% of parenchyma are involved; Grade 2: 34 to 66% of parenchyma are involved; Grade 3: >

132 66% of parenchyma are involved. Other parameters assessed were the presence or absence of
133 inflammation and fibrosis score (26).

134 The histological slides were analyzed and photographed in an Olympus® BX 51 optical
135 microscope. The pathologist who evaluated the sections was unaware of the treatment groups when
136 assessing the histology.

137

138 **Biochemical analysis**

139 Alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), gamma-glutamyl transaminase
140 (GGT) and plasma lipids, including total cholesterol and triglycerides, were measured enzymatically
141 by commercial available assay kits (Katal Biotecnológica, Minas Gerais, Brazil).

142

143 **RNA extraction and quantitative real-time PCR**

144 Frozen samples of liver (40 mg) were homogenized on ice in TRIzol Reagent (Invitrogen
145 Corporation, California, USA) according to the manufacture's instruction. The purity and
146 concentration of total RNA were determined by measuring the absorbance of aliquots at 260/ 280 ratio
147 nm. The integrity of RNA was checked on 2% agarose gel by inspecting the electrophoretic pattern of
148 28S and 18S ribosomal RNA. Total RNA (1 µg) from each sample was treated with DNase I
149 (Invitrogen Corporation California, USA) to remove contaminating genomic DNA, and reverse
150 transcribed to synthesize cDNA by using M-MLV reverse transcriptase (Promega Corporation,
151 Madison, WI, USA). For real-time PCR, 20 ng of cDNA and 0.4 µM of each primer were used in 25
152 µL volume reaction containing SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Inc., CA, USA).
153 The primers sequences used were: βA-activin (forward primer, 5'-
154 ATGGACCTAACTCTCAGCCAGA-3'; reverse primer, 5'-CTCTCCCCCTTCAAGCCCAT);
155 Follistatin (forward primer, 5'-GGCGTACTGCTTGAAGTGAA-3'; reverse primer, 5'-
156 GGGAAGCTGTAGTCCTGGTC-3') (27, 28).

157

158

159 **Statistical analysis**

160 Statistical analyses were performed by paired and unpaired student's t tests and analysis of
161 variance (ANOVA). Tukey's multiple comparisons test was used for post-hoc analysis of between-
162 group comparisons. Fisher's Exact test was used for categorical variables. Data are presented as means
163 \pm SEM. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data analyses were carried out using
164 STATISTICA (data analysis software system) version 7.

165

166 **Results**

167 **Body weight**

168 Body weight of high-fat diet fed animals was significantly higher than control animals
169 beginning at the 5th week till the end of the training period (Fig. 1). At 16th week, both exercised,
170 control and high-fat fed diet animals had significantly lower body weight compared to sedentary
171 controls and high-fat fed diet animals, respectively. Post-exercise body weight at 16th week was
172 significantly lower than pre-exercise body weight at 12th week in high-fat fed diet animals. However,
173 pre- and post-exercise body weights of control animals were not different.

174

175 **Glucose tolerance and insulin resistance tests**

176 Rats fed high-fat diet (HF) had significantly higher glycemia responses to both glucose and
177 insulin injections than control (C) rats after 12th weeks of diet regimen (Fig. 2A and 2B). Post-
178 exercise glycemia response to glucose injection was significantly lower than the pre-exercise test
179 response in HF-Swim rats (Fig. 2C). No difference was observed between pre- and post exercise
180 glycemia response to glucose injection in C-Swim rats.

181

182 **Liver enzymes and lipids**

183 ALT levels were significantly higher in HF-Sed animals than in C-Sed animals (41.7 ± 2.7 vs.
184 26.9 ± 1.4 U/L) and significantly lower in HF-Swim animals than in HF-Sed animals (31.6 ± 2.1 vs.

185 41.7 ± 2.7 U/L). AST, GGT, total cholesterol and triglycerides plasma levels did not vary among the
186 groups (data not shown).

187

188 **Liver expression of Activin β A subunit and Follistatin mRNA**

189 Activin β A subunit mRNA was significantly higher in HF-Swim than in HF-Sed, but no
190 difference was observed between C-Sed and C-Swim. Follistatin mRNA was significantly lower in C-
191 Swim and HF-Swim compared to C-Sed and HF-Sed, respectively (Fig. 3).

192

193 **Liver morphology**

194 Liver morphology varied significantly among the groups. There was no evidence of steatosis
195 or inflammation (grade 0) in rats fed standard rodent chow. In contrast, in rats fed high-fat diet the
196 severity of steatosis varied from grade 1 to grade 3. This was not associated with inflammation or
197 fibrosis. After the training period, rats fed high-fat diet showed improvement in the extent of liver
198 parenchyma damage, the severity of steatosis varying from grade 0 to grade 1 (Fig. 4).

199

200 **Discussion**

201 These data show that exercise reduces the deleterious effects of high-fat diet on liver and alters
202 the hepatic expression of both activin β A subunit and follistatin in this model of NAFLD in rats.

203 Obesity induced by high-fat diet was accompanied by decreased glucose tolerance as
204 previously described (28, 30). Training decreased insulin resistance in rats fed high-fat diet. It is well
205 established that exercise is linked to enhanced insulin sensitivity in diet-induced obese rats by
206 activation of components of the insulin-signaling cascade pathway in both skeletal muscle and liver
207 (31 – 33). However, it is important to consider the intensity, frequency and duration of the exercise.
208 Studies have reported that moderate aerobic exercise promotes reduction in body weight and adiposity,
209 improvement in lipid profile and attenuated hepatic steatosis suppressing HF diet-induced steatosis
210 (19, 20, 22, 34, 35).

211 NAFLD is a nomenclature used to describe a continuum of liver diseases ranging from simple
212 fatty deposition (steatosis) to inflammation, extensive fibrosis and cirrhosis, which develops in the
213 absence of excessive alcohol intake (1). NAFLD is associated with obesity, insulin resistance and the
214 metabolic syndrome (36). In this study, we used a rodent model of NAFLD as described by others (2,
215 6, 37). In this study, we used a validated histological scoring system to describe the histologic findings
216 in this model (26). The results show that high-fat diet produced fat accumulation of different degrees
217 but not inflammation or fibrosis. NAFLD is a complex disorder whose main initial pathological
218 process is the accumulation of fat within the hepatocytes. It is believed to result from an imbalance
219 between hepatic fatty acid synthesis/uptake and oxidation export (13, 37).

220 The results demonstrate that swimming training minimized the liver tissue damage caused by
221 high-fat diet as previously demonstrated (18 – 20, 22, 38). The beneficial effects of exercise have
222 been attributed to increase insulin sensitivity and fat oxidation and decreased lipid synthesis in liver
223 through the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway (18, 22, 39, 40). In the
224 present study, body weight decreased in rats fed high-fat diet and exercised. However,
225 mechanistically, the pathogenesis of NAFLD is incompletely understood.

226 In the present study, it was observed that the mRNA expression of activin A and follistatin
227 varied reciprocally in exercised and sedentary high-fat fed animals, suggesting a local adaptive
228 regulation to promote an increase in activin A biological effect. Activin A has previously been
229 reported to have profound involvement in liver function and in the pathogenesis of liver disease,
230 including NAFLD (7 – 11, 13, 41, 42). However, we show for the first time that activin and follistatin
231 may be involved in the beneficial effect exerted by exercise on NAFLD. Follistatin is a binding
232 protein that acts as an extracellular factor to bind and inactivate activin (43). Activin/follistatin
233 represent a complex circuitry that has local autocrine/paracrine function and at the same time may be
234 self-modulated (44, 45). Many studies have described potential mechanisms that could explain the role
235 of activin/follistatin in exercise-induced liver adaptation. In this regard, activins have been shown to
236 be associated with insulin production and insulin sensitivity as well as with fat oxidation in liver and
237 other tissues (11, 12, 46, 47). In addition, the role of activin A as an anti-inflammatory cytokine has

238 been demonstrated (48, 49). Inflammation is an important mechanism involved in both insulin
239 resistance and NAFLD (12, 50). Interestingly, it has been recently shown that exercise induces
240 increase in plasma follistatin suggesting that follistatin may be a contraction-induced hepatokine (25).

241 In conclusion, the results show that exercise may reduce the deleterious effects of high-fat diet
242 on liver and suggest that the local expression of activin-follistatin may be involved.

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265 **References**

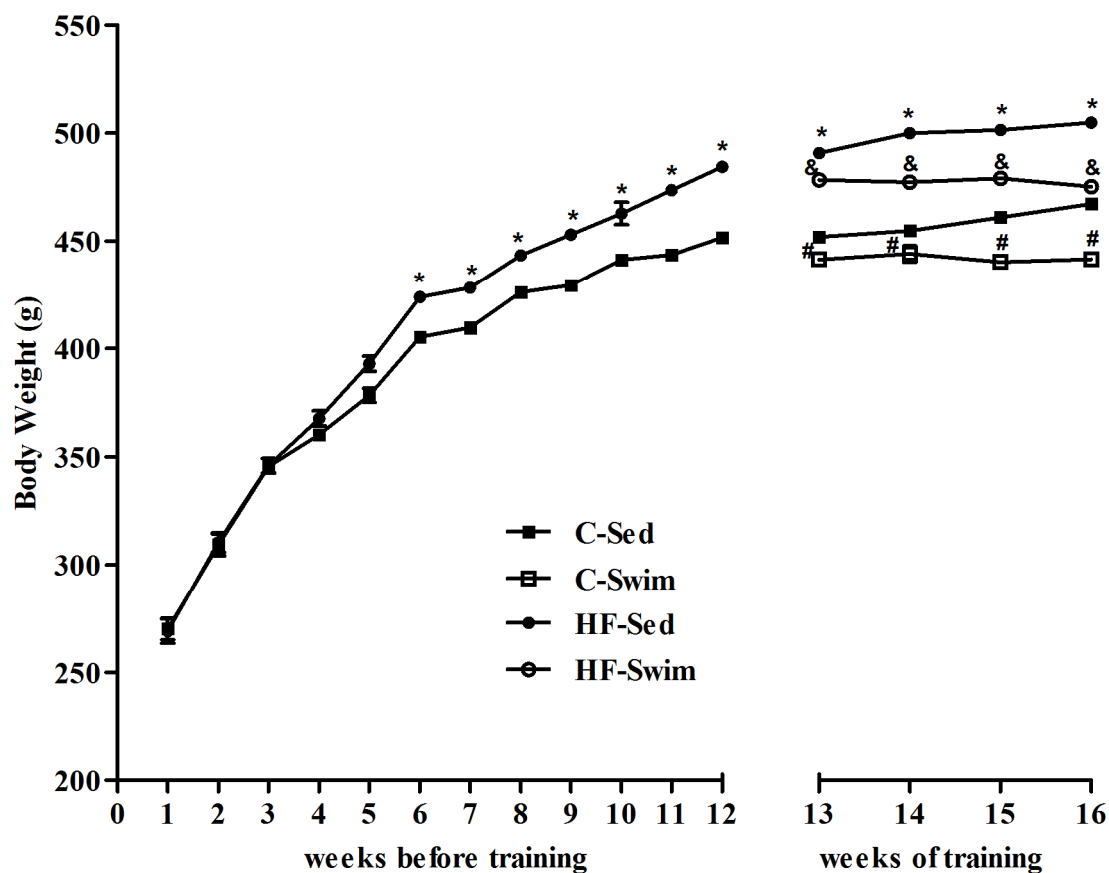
- 266 1. **Brunt EM** 2001 Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. *Semin Liver Dis*
267 21:3-16
- 268 2. **Ahmed U, Redgrave TG, Oates PS** 2009 Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty
269 liver in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 24:1463-1471
- 270 3. **Deng QG, She H, Cheng JH, French SW, Koop DR, Xiong S, Tsukamoto H** 2005
271 Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology* 42:905-914
- 272 4. **Smith BW, Adams LA** 2011 Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48:97-
273 113
- 274 5. **Fong DG, Nehra V, Lindor KD, Buchman AL** 2000 Metabolic and nutritional
275 considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 32:3-10
- 276 6. **Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM** 2004
277 Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 79:502-9
- 278 7. **Takabe K, Wang L, Leal AM, Macconell LA, Wiater E, Tomiya T, Ohno A, Verma
279 IM, Vale W** 2003 Adenovirus-mediated overexpression of follistatin enlarges intact liver of
280 adult rats. *Hepatology* 38:1107-15
- 281 8. **Rodgarkia-Dara C, Vejda S, Erlach N, Losert A, Bursch W, Berger W, Schulte-
282 Hermann R, Grusch M** 2006 The activin axis in liver biology and disease. *Mutat Res*
283 613:123-37
- 284 9. **Werner S, Alzheimer C** 2006 Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory
285 disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:157-71
- 286 10. **Deli A, Kreidl E, Santifaller S, Trotter B, Seir K, Berger W, Schulte-Hermann
287 R, Rodgarkia-Dara C, Grusch M** 2008 Activins and activin antagonists in hepatocellular
288 carcinoma. *World J Gastroenterol* 14:1699-709
- 289 11. **Yndestad A, Haukeland JW, Dahl TB, Bjørø K, Gladhaug IP, Berge C, Damås
290 JK, Haaland T, Løberg EM, Linnestad P, Birkeland K, Konopski Z, Halvorsen B, Berge
291 RK, Aukrust P** 2009 A Complex role of activin A in non-alcoholic fatty liver disease. *Am J*
292 *Gastroenterol* 104:2196-205
- 293 12. **Hashimoto O, Funaba M** 2011 Activin in glucose metabolism. *Vitam Horm* 85:217-34
- 294 13. **Yndestad A, Haukeland JW, Dahl TB, Halvorsen B, Aukrust P** 2011 Activin A
295 in nonalcoholic fatty liver disease. *Vitam Horm* 85:323-42
- 296 14. **Kogure K, Omata W, Kanzaki M, Zhang YQ, Yasuda H, Mine T, Kojima I** 1995 A single
297 intraportal administration of follistatin accelerates liver regeneration in partially
298 hepatectomized rats. *Gastroenterology* 108:1136-42
- 299 15. **Endo D, Maku-Uchi M, Kojima I** 2006 Activin or follistatin: which is more beneficial to
300 support liver regeneration after massive hepatectomy? *Endocr J* 53:73-8
- 301 16. **Ooe H, Chen Q, Kon J, Sasaki K, Miyoshi H, Ichinohe N, Tanimizu N, Mitaka T** 2011
302 Proliferation of rat small hepatocytes requires follistatin expression. *J Cell Physiol* doi:
303 [10.1002/jcp.22971](https://doi.org/10.1002/jcp.22971)
- 304 17. **Colberg SR, Albright AL, Blissmer BJ, Braun B, Chasan-Taber L, Fernhall
305 B, Regensteiner JG, Rubin RR, Sigal RJ** 2010 Exercise and type 2 diabetes: American
306 College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement.
307 Exercise and type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc* 42:2282-303
- 308 18. **Lavoie JM, Gauthier MS** 2006 Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-
309 alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci* 63:1393-409
- 310 19. **He Y, Zhang H, Fu F** 2008 The effects of swimming exercise on high-fat-diet-
311 induced steatohepatitis. *J Sports Med Phys Fitness* 48:259-65
- 312 20. **Sene-Fiorese M, Duarte FO, Scarmagnani FR, Cheik NC, Manzoni MS, Nonaka
313 KO, Rossi EA, de Oliveira Duarte AC, Dâmaso AR** 2008 Efficiency of intermittent
314 exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*
315 16:2217-22

- 316 21. **Bergasa NV, Mehlman J, Bir K** 2004 Aerobic exercise: a potential therapeutic intervention
317 for patients with liver disease. *Med Hypotheses* 62:935-41
- 318 22. **Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA** 2010 Swimming
319 training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Toxicol*
320 *Pathol* doi:10.1016/j.etp.2010.08.019
- 321 23. **Bueno PG, Bassi D, Contrera DG, Carnielli HM, Silva RN, Nonaka KO, Selistre-de-**
322 **Araújo HS, Leal AM** 2011 Post-exercise changes in myostatin and actRIIB expression in
323 obese insulin-resistant rats. *Mol Cell Endocrinol* 339:159-64
- 324 24. **Dutra DB, Bueno PG, Silva RN, Nakahara NH, Selistre-Araújo HS, Nonaka KO, Leal**
325 **AM** 2012 Expression of myostatin, myostatin receptors and follistatin in diabetic rats
326 submitted to exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol* doi: 10.1111/j.1440-1681.2012.05690.x
- 327 25. **Hansen J, Brandt C, Nielsen AR, Hojman P, Whitham M, Febbraio MA, Pedersen**
328 **BK, Plomgaard P** 2011 Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence
329 that follistatin is a contraction-induced hepatokine. *Endocrinology* 152:164-71
- 330 26. **Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell**
331 **LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ** 2005
332 Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.
333 *Hepatology* 41:1313-21
- 334 27. **Gold EJ, Francis RJ, Zimmermann A, Mellor SL, Cranfield M, Risbridger GP, Groome**
335 **NP, Wheatley AM, Fleming JS** 2003 Changes in activin and activin receptor subunit
336 expression in rat liver during the development of CCL4-induced cirrhosis. *Mol Cell*
337 *Endocrinol* 201:143-53
- 338 28. **Ferreira MC, Cavallo IK, Florio P, Petraglia F, Reis FM** 2008 Activin betaA subunit,
339 follistatin and follistatin-like 3 are expressed in the endometrium of ovariectomized rats and
340 regulated by estrogen replacement. *J Mol Histol* 39:535-41
- 341 29. **Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW** 2002 Long-term high-
342 fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am J Physiol*
343 *Endocrinol Metab* 282:1231-8
- 344 30. **Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P** 2003 A controlled high-fat diet
345 induces an obese syndrome in rat. *J Nutr* 133:1081-7
- 346 31. **Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso**
347 **LA, Carvalheira JB, Saad MJ** 2008 Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the
348 insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese
349 Wistar rats. *J Physiol* 586:659-71
- 350 32. **Yaspelkis BB 3rd, Lessard SJ, Reeder DW, Limon JJ, Saito M, Rivas DA, Kvasha**
351 **I, Hawley JA** 2007 Exercise reverses high-fat diet induced impairments on
352 compartmentalization and activation of components of the insulin-signaling cascade in
353 skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:941-9
- 354 33. **De Souza CT, Frederico MJ, da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR, Velloso LA**
355 2010 Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo
356 1/HNF-4 alpha pathway in insulin resistant mice. *J Physiol* 588:2239-53
- 357 34. **Marques CM, Motta VF, Torres TS, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA** 2010
358 Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and nonalcoholic fatty
359 liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. *Braz J Med Biol Res* 43:467-75
- 360 35. **Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM** 2004
361 Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats.
362 *Nutrition* 20:218-24
- 363 36. **Utzhneider KM, Kahn SE** 2006 Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic
364 fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4753-61
- 365 37. **London RM, George J** 2007 Pathogenesis of NASH: animal models. *Clin Liver Dis* 11:55-74
- 366 38. **Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, Lavoie JM** 2004 Effects of introducing
367 physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose
368 tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:1064-71

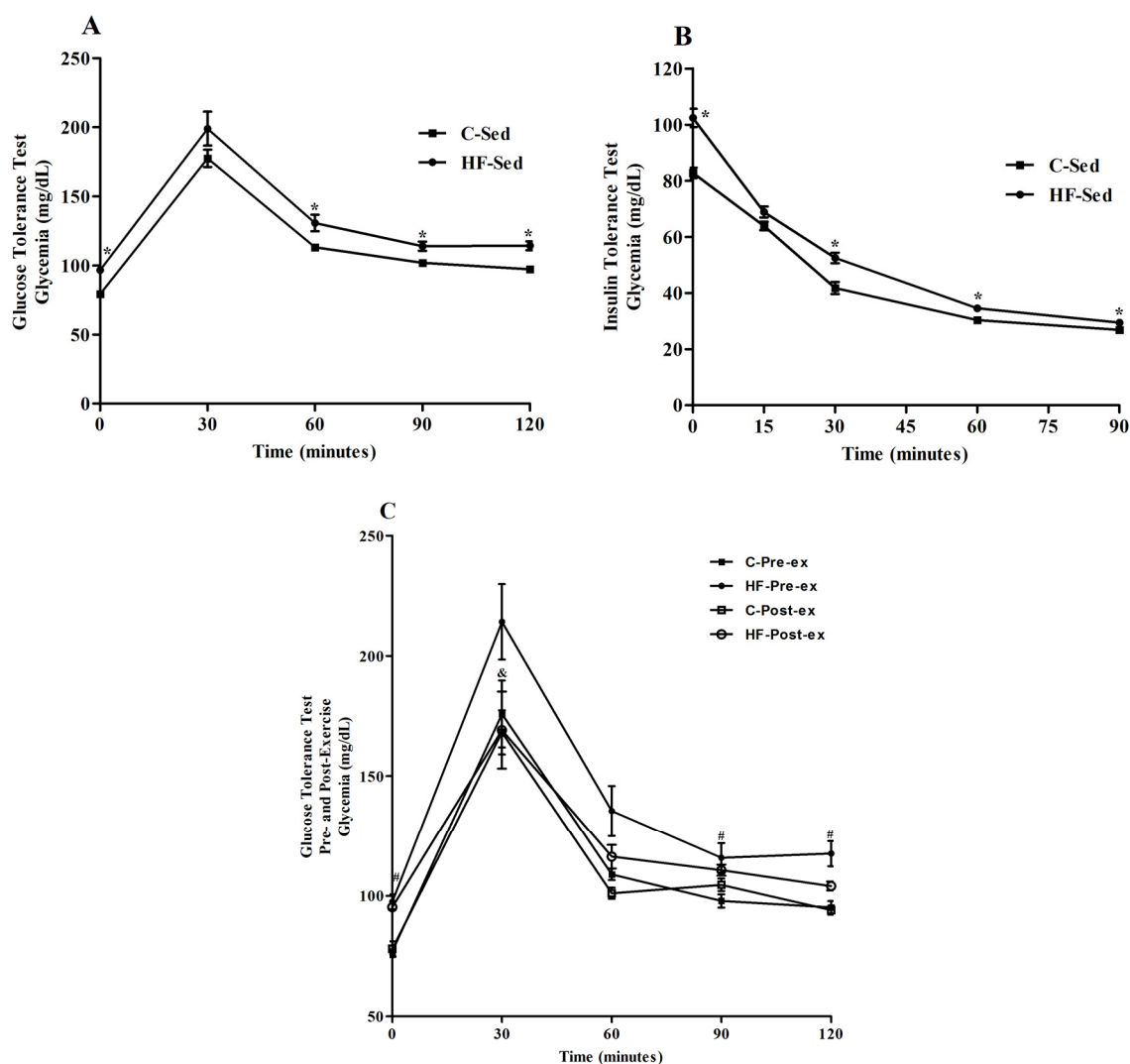
- 369 39. **Carlson CL, Winder WW** 1999 Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA
370 carboxylase during and after exercise. *J Appl Physiol* 86:669-74.
- 371 40. **Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, Saha**
372 **AK** 2002 Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate
373 acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in
374 response to exercise. *J Biol Chem* 277:32571-7
- 375 41. **Yasuda H, Mine T, Shibata H, Eto Y, Hasegawa Y, Takeuchi T, Asano S, Kojima I** 1993
376 Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. *J Clin*
377 *Invest* 92:1491-6
- 378 42. **Gold EJ, Zhang X, Wheatley AM, Mellor SL, Cranfield M, Risbridger GP, Groome**
379 **NP, Fleming JS** 2005 betaA- and betaC-activin, follistatin, activin receptor mRNA and
380 betaC-activin peptide expression during rat liver regeneration. *J Mol Endocrinol* 34:505-15
- 381 43. **Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S, Ling N** 1991 Follistatin binds to both activin and
382 inhibin through th common subunit. *Endocrinology* 128:3313-5
- 383 44. **Leal AM, Blount AL, Donaldson CJ, Bilezikjian LM, Vale WW** 2003 Regulation of
384 follicle-stimulating hormone secretion by the interactions of activin-A, dexamethasone and
385 testosterone in anterior pituitary cell cultures of male rats. *Neuroendocrinology* 77:298-304
- 386 45. **Bilezikjian LM, Blount AL, Leal AM, Donaldson CJ, Fischer WH, Vale WW** 2004
387 Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. *Mol*
388 *Cell Endocrinol* 225:29-36
- 389 46. **Mine T, Kojima I, Ogata E** 1989 Stimulation of glucose production by activin-A in isolated
390 rat hepatocytes. *Endocrinology* 125:586-91
- 391 47. **Mine T, Yasuda H, Fujita T, Hasegawa Y** 1996 Effects of inhibin on activin A-
392 induced glucose metabolism in rat hepatocytes. *Endocrine* 5:41-6
- 393 48. **Cuschieri J, Bulger E, Grinsell R, Garcia I, Maier RV** 2008 Insulin regulates macrophage
394 activation through activin A. *Shock* 29:285-90
- 395 49. **Jones KL, Mansell A, Patella S, Scott BJ, Hedger MP, de Kretser DM, Phillips DJ** 2007
396 Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein,
397 follistatin, reduces mortality in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16239-44
- 398 50. **Schenk S, Saberi M, Olefsky JM** 2008 Insulin sensitivity: modulation by nutrients and
399 inflammation. *J Clin Invest* 118:2992-3002
- 400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412

413 Figures and tables

414

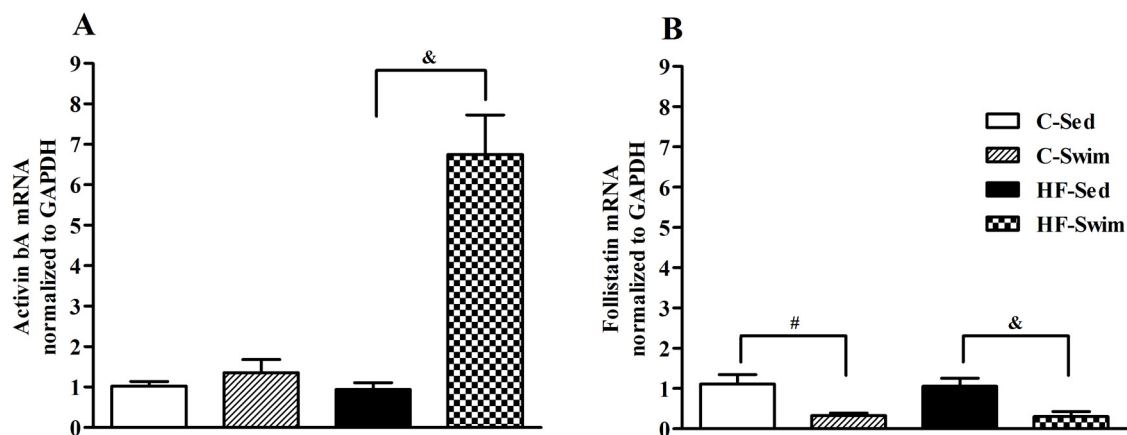


415 **FIG 1.** Body weight (g) in control and high-fat diet fed rats. Values are means \pm S.E.M., n = 6–7
 416 rats/group. *P < 0.05, sedentary high-fat diet group (HF-Sed) vs. sedentary control group (C-Sed); #P <
 417 0.05, sedentary control group (C-Sed) vs. exercised control group (C-Swim); &P < 0.05, sedentary
 418 high-fat diet group (HF-Sed) vs. exercised high-fat diet group (HF-Swim).
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425



426
 427 **FIG 2.** A, Analysis of glycemia profile in glucose tolerance test (GTT) and B, in insulin tolerance test
 428 (ITT) at the end of 12th week in rats fed high-fat diet. C, Analysis of glycemia profile in glucose
 429 tolerance test (GTT) pre-exercise (12th week) and post-exercise (16th week) training. Values are
 430 means \pm S.E.M., $n = 15$ rats/group and $n = 6-7$ rats/group. * $P < 0.05$, high-fat diet group (HF)
 431 vs. control group (C). # $P < 0.05$, exercised high-fat diet group pre-exercise (HF-Swim pre-exercise) vs.
 432 exercised control group pre-exercise (C-Swim pre-exercise); & $P < 0.05$, exercised high-fat diet group
 433 pre-exercise (HF-Swim pre-exercise) vs. exercised high-fat diet group post-exercise (HF-Swim post-
 434 exercise).

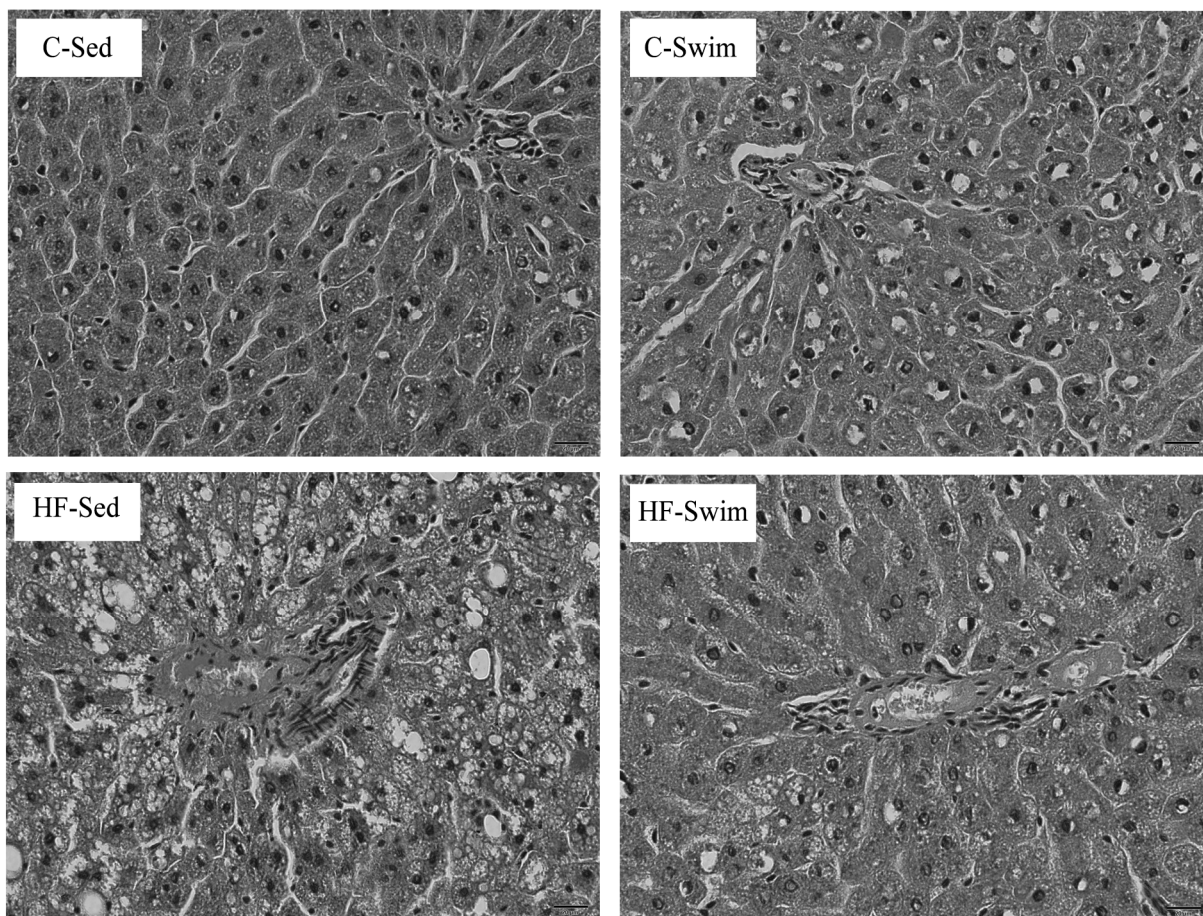
435
 436
 437
 438



439
440

441 **FIG 3.** A, Activin β A and B, Follistatin mRNA expression in liver of Wistar rats. Values are means \pm
442 S.E.M., n = 6–7 rats/group. #P < 0.05, sedentary control group (C-Sed) vs. exercised control group (C-
443 Swim); &P < 0.05, sedentary high-fat diet group (HF-Sed) vs. exercised high-fat diet group (HF-
444 Swim).

445
446
447
448
449
450
451
452



453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476

FIG 4. Histological analysis of liver from rats fed standard rodent chow and high-fat diet. Representative microscopic pictures of hematoxylin-eosin-stained sections (Bar = 20 µm) were used. C-Sed, Sedentary control group; C-Swim, Exercised control group; HF-Sed, Sedentary high-fat diet group; HF-Swim, Exercised high-fat diet group.

477