

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E  
TECNOLOGIAS**

---

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO DO LTB4R1 EM  
CAMUNDONGOS SWISS OBESOS**

**IRINEU OTAVIO MARCHIORI CALLEGARI**

**Rio Claro – SP**

**2022**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO HUMANO E  
TECNOLOGIAS**

---

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO DO LTB4R1 EM  
CAMUNDONGOS SWISS OBESOS**

**IRINEU OTAVIO MARCHIORI CALLEGARI**

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências do Câmpus  
de Rio Claro, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre  
em Desenvolvimento Humano e  
Tecnologias.

**Rio Claro – SP**

**2022**

C157e

Callegari, Irineu Otavio Marchiori

Efeitos do exercício físico na expressão do LTB4R1 em camundongos swiss obesos / Irineu Otavio Marchiori Callegari. -- Rio Claro, 2022

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Alexandre Gabarra de Oliveira

1. Obesidade. 2. Inflamação. 3. Atividade física. 4. Sistema Imune. 5. Resistência à insulina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA EXPRESSÃO DO LTB4R1 EM CAMUNDONGOS SWISS OBESOS

**AUTOR: IRINEU OTAVIO MARCHIORI CALLEGARI**

**ORIENTADOR: ALEXANDRE GABARRA DE OLIVEIRA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Humano e Tecnologias, área: Tecnologias nas Dinâmicas Corporais pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ALEXANDRE GABARRA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Educação Física / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. BRUNO DE MELO CARVALHO (Participação Virtual)  
Instituto de Ciências Biológicas / Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. DANILO SALES BOCALINI (Participação Virtual)  
Departamento de Desportos / Universidade Federal do Espírito Santo

Rio Claro, 24 de novembro de 2022

Dedico este trabalho especialmente a minha querida mãe, Sônia Regina Marchiori, que infelizmente não está mais entre nós, mas que enquanto professora, serviu de exemplo para mostrar o mais alto nível de influência que um educador pode exercer. Como mãe, levou uma vida dedicada a educação dos filhos, incentivou, contribuiu e comemorou cada momento que presenciou em minha trajetória acadêmica até o momento de sua partida.

Amo você.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, sou grato a Deus em permitir que eu iniciasse, superasse e, por fim, conseguisse terminar esse desafio. Não posso deixar de estender a mão a Ele, uma vez que muitas foram as pedras no caminho. Agradeço a Ele também pela vida, pois em meio a uma pandemia mundial, permitiu com que eu continuasse em frente, com saúde, força e discernimento.

Por muitas vezes, penso que todo feito meu não seria possível se não houvesse o esforço primeiro de alguém. Dessa forma agradeço aos meus pais por tudo que fizeram por mim enquanto vivos. Irineu Roberto Callegari e Sônia Regina Marchiori, obrigado não só por darem todas as condições e investir na minha educação, mas por todo apoio nos momentos de fraqueza, por sustentarem todo meu aprendizado e servirem de suporte por trás das minhas conquistas, sempre com amor, paciência e destreza. Hoje não tenho mais vocês dois comigo, mas tenho tudo que preciso graças a vocês.

Sem dúvida nenhuma, agradeço as duas maiores apoiadoras desse projeto, minha esposa Milena Ferrarezi, e nossa filha Maitê, que chegou no meio deste desafio para colorir a linha chegada, dando ainda mais brilho e força para sempre seguir em frente. Sem vocês, nada eu teria alcançado, nada teria valido a pena. Nas dificuldades, junto a vocês encontrei abrigo, força e superação para continuar a jornada. Com toda a certeza, a parte mais difícil desse trabalho foram vocês duas que realizaram, pois sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira pela oportunidade de ser seu aluno, pelo ensinamento e suporte que tive ao longo dessa dissertação. Agradeço por sempre estar disponível e acessível nos momentos que precisei. Com certeza, não aprendi somente a teoria e prática voltada à pesquisa, mas claramente levarei para a vida tudo que aprendi ao seu lado.

Aos membros do LABIMEF (IB-UNESP), meu sincero obrigado pelo apoio ao longo dos experimentos, obrigado pela companhia e pelo crescimento. Aproveito para agradecer também a todos que pertencem ao LICRI (FCM-UNICAMP), pois foi lá que aprendi e realizei as análises e técnicas aqui descritas. Meu agradecimento em especial à Heloisa Balan Assalin e Andrey Santos que, sem nenhuma restrição, compartilharam anos

de pesquisa comigo. Seus conhecimentos, paciência e profissionalismo permitiram com que essa dissertação fosse devidamente realizada.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

## RESUMO

A epidemia global de obesidade traz consigo o aumento dos níveis de inflamação subclínica e crônica, além do aumento da resistência à insulina (RI) no tecido adiposo, músculo-esquelético e fígado, e que certamente contribuiu com o desenvolvimento de doenças crônicas. Recentemente, foi descoberto o papel do leucotrieno B4 (LTB4), molécula lipídica compatível a polarização de macrófagos em sentido M1 e quimiotaxia de células da imunidade adaptativa quando acoplada ao seu receptor (LTB4R1). O aumento da expressão de LTB4 ocorre na presença da RI instaurada pela dieta hiperlipídica (DH). Dessa forma, objetivamos atenuar o estado inflamatório de camundongos *swiss* obesos tratados com DH por meio da prática do exercício físico, considerado ferramenta não-farmacológica para regular o metabolismo glicêmico e a inflamação. Os animais foram divididos em grupos: animais controle (CTL), animais obesos alimentados com dieta hiperlipídica (DH), animais exercitados cronicamente (4 semanas, 5 vezes na semana) e alimentados com dieta hiperlipídica (DH+EC), e animais exercitados agudamente e alimentados com dieta hiperlipídica (DH+EA). Após 12 semanas, foram realizados testes de tolerância intraperitoneal à glicose (GTT) e à insulina (ITT), que indicou aumento da glicemia de jejum, intolerância à glicose e redução da via de sinalização à insulina em conjunto com o ganho de peso significativo dos grupos alimentados em DH. Quatro semanas de exercício físico aeróbio de moderada intensidade não foram suficientes para reduzir significativamente o peso corporal dos animais, mas houve redução significativa da intolerância à glicose e melhora da sensibilidade à insulina nos grupos DH+EA e DH+EC diante das análises de imunoblotting, assim como melhora da fosforilação em serina de IR e AKT. Houve aumento do RNAm de LTB4R1 no músculo-esquelético, verificado por meio da RT-PCR Real Time. O exercício crônico reduziu parcialmente os níveis de LTB4R1 e TNF- $\alpha$  no músculo-esquelético e tecido adiposo, seguido de aumento não significativo da expressão de IL-4 no músculo-esquelético, fígado e tecido adiposo. O exercício físico mostrou uma tendência de melhora na expressão do LTB4 no músculo-esquelético, porém foi considerado insuficiente para reverter os níveis de inflamação alcançados pela dieta rica em gordura.

**Palavras-chave:** obesidade, inflamação, resistência à insulina, atividade física, sistema imune, saúde.

## **ABSTRACT**

The global obesity epidemic brings with it increased levels of subclinical and chronic inflammation, in addition to increased insulin resistance (IR) in adipose tissue, skeletal muscle and liver, which certainly contributes to the development of chronic diseases. Recently, the role of leukotriene B4 (LTB4) was discovered, a lipid molecule compatible with the polarization of macrophages in the M1 sense and chemotaxis of adaptive immune cells when coupled to its receptor (LTB4R1). The increase in the expression of LTB4 occurs in the presence of the IR established by the high fat diet (DH). Thus, we aimed to attenuate the inflammatory state of obese Swiss mice treated with HD through physical exercise, considered a non-pharmacological tool to regulate glycemic metabolism and inflammation. The animals were divided into groups: control animals (CTL), obese animals fed a high fat diet (HD), chronically exercised animals (4 weeks, 5 times a week) and fed a high fat diet (DH+EC), and acutely exercised animals and fed a high fat diet (DH+EA). After 12 weeks, intraperitoneal glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance tests were performed, which indicated increased fasting glucose, glucose intolerance, and reduced insulin signaling together with significant weight gain in the fed groups. in DH. Four weeks of moderate-intensity aerobic physical exercise was not enough to significantly reduce the animals' body weight, but there was a significant reduction in glucose intolerance and an improvement in insulin sensitivity in the DH+EA and DH+EC groups in the face of immunoblotting analyses, as well as an improvement in serine phosphorylation of IR and AKT. There was an increase in LTB4R1 mRNA in skeletal muscle, verified by Real Time RT-PCR. Chronic exercise partially reduced LTB4R1 and TNF- $\alpha$  levels in skeletal muscle and adipose tissue, followed by a non-significant increase in IL-4 expression in skeletal muscle, liver and adipose tissue. Physical exercise showed a tendency to improve LTB4 expression in skeletal muscle, but it was considered insufficient to reverse the levels of inflammation achieved by a high-fat diet.

**Keywords: obesity, inflammation, insulin resistance, physical activity, immune system, health.**

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estimativa mundial de adultos com diabetes (20-79 anos de idade) de 2015 a 2040 (projetado).....	15
<b>Figura 2.</b> (A) Via de sinalização da insulina e translocação de GLUT-4 em condições normais. (B) Mecanismos de redução na via de sinalização insulínica.....	16
<b>Figura 3.</b> (A) síntese de LTB4 em animais magros e com obesidade induzida pela DH. (B) Ação do LTB4 junto ao seu receptor de alta afinidade (LTB4R1) acoplado a proteína G, localizado no fígado, tecido adiposo e músculo em função da obesidade. (C) Efeitos da inibição farmacológica e depleção gênica do eixo LTB4-LTB4R1.....	23
<b>Figura 4.</b> Evolução do peso corporal e peso final dos animais diante do protocolo de exercício agudo.....	35
<b>Figura 5.</b> Resultados da medição de glicose sérica em relação ao protocolo de exercício agudo.....	36
<b>Figura 6.</b> Teste de tolerância à glicose (GTT) diante do protocolo de exercício agudo.	36
<b>Figura 7.</b> Caracterização da sensibilidade à insulina (kITT) diante do protocolo de exercício agudo.....	37
<b>Figura 8.</b> Efeito da dieta rica em gordura e do exercício físico sobre a sinalização de insulina após protocolo de exercício agudo.....	38
<b>Figura 9.</b> Níveis de RNAm relativo para LTB4R1 diante do protocolo de exercício agudo .....	39
<b>Figura 10.</b> Níveis de RNAm relativo das citocinas no TAB de camundongos obesos diante do protocolo de exercício agudo.....	40
<b>Figura 11.</b> Níveis de RNAm relativo das citocinas no fígado de camundongos obesos diante do protocolo de exercício agudo.....	40

<b>Figura 12.</b> Níveis de RNAm relativo das citocinas no ME de camundongos obesos diante do protocolo de exercício agudo.....	41
<b>Figura 13.</b> Evolução do peso corporal e peso final dos animais diante do protocolo de exercício crônico.....	42
<b>Figura 14.</b> Resultados da medição de glicose sérica em relação ao protocolo de exercício crônico.....	43
<b>Figura 15.</b> Teste de tolerância à glicose (GTT) diante do protocolo de exercício crônico.....	43
<b>Figura 16.</b> Caracterização da sensibilidade à insulina (kITT) diante do protocolo de exercício crônico.....	44
<b>Figura 17.</b> Efeito da dieta rica em gordura e do exercício físico sobre a sinalização de insulina após protocolo de exercício crônico.....	45
<b>Figura 18.</b> Níveis de RNAm relativo para LTB4R1 diante do protocolo de exercício crônico.....	46
<b>Figura 19.</b> Níveis de RNAm relativo das citocinas no TAB de camundongos obesos diante do protocolo de exercício crônico.....	47
<b>Figura 20.</b> Níveis de RNAm relativo das citocinas no fígado de camundongos obesos diante do protocolo de exercício crônico.....	47
<b>Figura 21.</b> Níveis de RNAm relativo das citocinas no ME de camundongos obesos diante do protocolo de exercício crônico.....	48

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Composição da dieta hiperlipídica .....	28
<b>Tabela 2.</b> Mistura de sais minerais da dieta.....	28
<b>Tabela 3.</b> Descrição das vitaminas contidas na dieta.....	29
<b>Tabela 4:</b> Descrição dos anticorpos.....	32
<b>Tabela 5.</b> Descrição dos primers utilizados.....	34

## Lista de Abreviaturas e Siglas

5-LO	5-lipoxigenase
5-HETE	Ácido 5-hidroperoxyeicosatetraenoico
AGL	Ácidos graxos livres
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
KO	Animais knockout
LTB4R1KO	Animais knockout para LTB4R1
WT	Animais wide-type
JNK	C-Jun N-terminal kinases
CT	limiar de ciclo
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DH	Dietas hiperlipídicas
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
cpla2	Fosfolipase A2 citosólica
SVF	Fração vascular estromal
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL	Interleucina
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
CCL-2	Ligante de quimiocina-2
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA4-H	LTA4 hidrolase
MTAB	Macrófagos no tecido adiposo branco
ME	Musculoesquelético
OMS	Organização mundial de saúde
PHG	Produção hepática de glicose
FLAP	Proteína ativadora do 5-LO âncora de membrana

MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
AKT	Proteína quinase B
PDK-1	Proteína-quinase-1
IR- $\beta$	Receptor de insulina, subunidade- $\beta$
LTB4R1	Receptor de LTB4 acoplado a proteína G
G $\alpha$ i	Receptor ligado a proteína G
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
TLR-4	Receptores do tipo toll-4
RI	Resistência à insulina
RNA <sub>m</sub>	RNA (ácido ribonucleico) mensageiro
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
epi-TAB	Tecido adiposo epididimal
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GTT	Testes de tolerância intraperitoneal à glicose
ITT	Testes de tolerância intraperitoneal à insulina
kITT	Constante da velocidade de decaimento da glicose durante o ITT

## Sumário

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	Como pode a dieta hiperlipídica induzir a resistência à insulina?.....	15
1.2	Inflamação nos tecidos sensíveis à insulina: o papel da imunidade.....	17
1.3	Efeitos do exercício físico na resistência à insulina e inflamação.....	20
1.4	Leucotrieno B4 como marcador inflamatório da resistência à insulina induzida pela obesidade.....	21
2.	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	26
3.	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
4.	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	28
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	35
5.1	<b>RESPOSTAS DO PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO</b> .....	35
5.1.1	Caracterização da obesidade e resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica.....	35
5.1.2	Respostas do exercício físico na via de sinalização da insulina e homeostase da glicose .....	37
5.1.3	Efeitos do exercício físico agudo na expressão gênica do LTB4R1.....	38
5.1.4	Expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido adiposo branco, fígado e músculo-esquelético .....	39
5.2	<b>RESPOSTAS DO PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO CRÔNICO</b> ..	42
5.2.1	Caracterização da obesidade e resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica diante do exercício crônico.....	42
5.2.2	Respostas do exercício físico na via de sinalização da insulina e homeostase da glicose .....	44
5.2.3	Efeitos do exercício físico crônico na expressão gênica do LTB4R1 .....	45
5.2.4	Expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido adiposo, fígado e músculo-esquelético .....	46
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
7.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	58
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
9.	<b>ANEXOS</b> .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

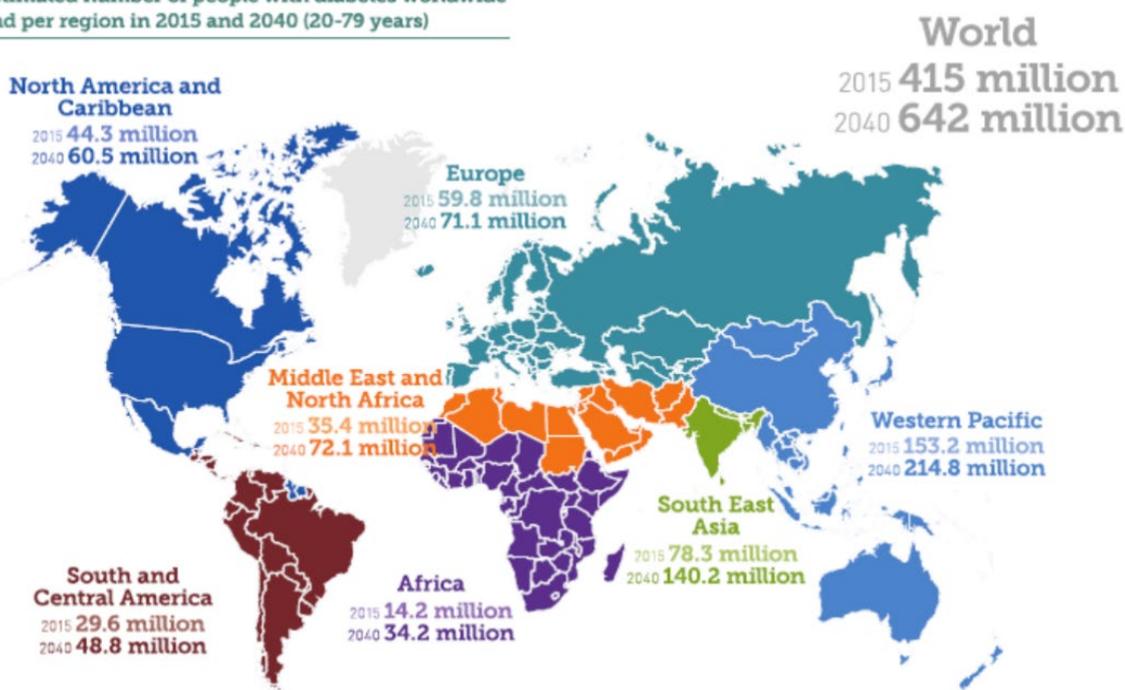
Diante da epidemia global de obesidade desenvolvida ao longo dos últimos anos, tornou-se muito bem estabelecida sua relação com prejuízos à saúde e o desenvolvimento de doenças crônicas <sup>1</sup>. Portanto, o ganho de peso corporal tem sido apontado como um importante fator de risco, associado, inclusive, ao índice de mortalidade mundial <sup>2</sup>. No Brasil, dados mostraram que nos últimos 10 anos, o excesso de peso e obesidade têm crescido a ponto de já atingir mais da metade da população, dada complexidade multifatorial deste distúrbio metabólico <sup>3; 4</sup>. Segundo a organização mundial de saúde (OMS), o estilo de vida sedentário, aliado aos processos de urbanização e globalização, facilitaram o acúmulo de comorbidades ao longo dos anos. Significa dizer que o diagnóstico para excesso de peso tem aumentado nas pessoas a uma taxa alarmante, e pior: estimativas indicam o crescimento deste quadro para os próximos anos <sup>2</sup>.

Além disso, a alta taxa de adiposidade central, tido como importante fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular, também modifica o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina <sup>5</sup>. Assim, o desenvolvimento da resistência à insulina (RI) tende a avançar até o diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) <sup>6</sup>. Como é consolidado que a DM2 é uma condição crônica desenvolvida ao longo dos anos, parece lógico concluir que a epidemia de obesidade seja seu motor principal <sup>7</sup>. Evans et al. <sup>8</sup>, constataram que em 2016 havia 415 milhões de pessoas com DM2 no mundo. Entretanto, em 2040 estima-se que haverá mais de 640 milhões de pessoas com DM2.

Além disso, as últimas décadas revelaram que o principal elo entre a obesidade e a RI parece ser um processo inflamatório subclínico e crônico que ocorre tanto em humanos quanto em modelo animal <sup>9; 10</sup>. Tal processo é tido como uma das principais causas da diminuição da sensibilidade à insulina e desenvolvimento de DM2 em indivíduos obesos <sup>11</sup>, uma vez que a liberação de citocinas pró-inflamatórias evolui para um estado denominado de meta-inflamação, conhecida também como inflamação crônica de baixo grau. Dessa forma, a busca por estratégias para conter o ganho de peso, RI e as complicações inerentes ao processo inflamatório crônico tem sido amplamente investigadas, com intuito de compreender parte desses mecanismos, além propor as formas de tratamento adequadas. Nesse sentido, o exercício físico tem se mostrado como ferramenta não-farmacológica para o reduzir a adiposidade corporal, melhorar os indicadores da inflamação e restaurar a sensibilidade à insulina. Portanto, é reconhecido o papel do exercício, tanto na prevenção e tratamento da RI ligada a obesidade, como na melhora da saúde da população<sup>12</sup>.

Figura 1. Estimativa mundial de adultos com diabetes (20-79 anos de idade) de 2015 a 2040

Estimated number of people with diabetes worldwide and per region in 2015 and 2040 (20-79 years)



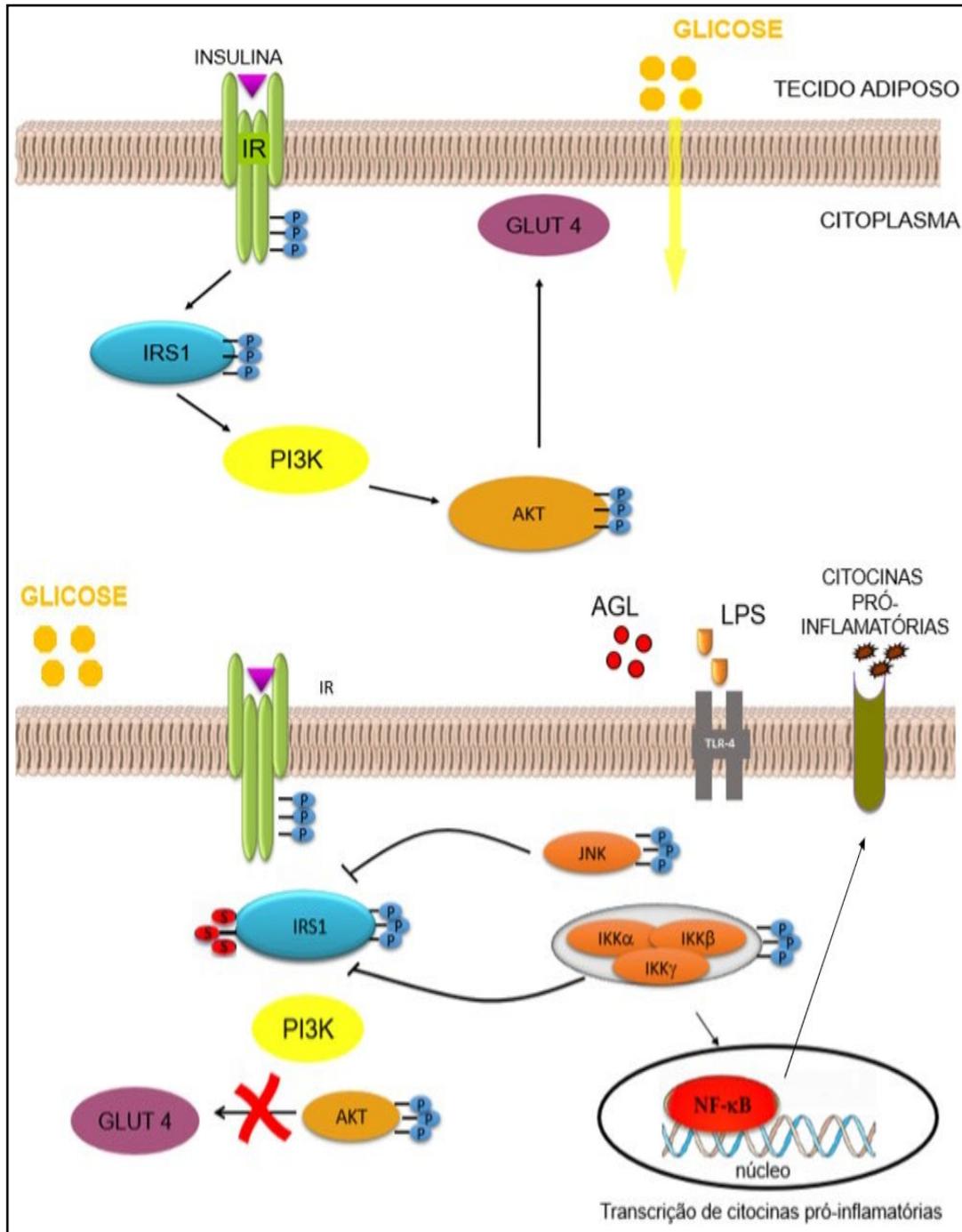
Fonte: Federação Internacional de Diabetes. Atlas de Diabetes da IDF, 7ª edição. Disponível em: [http://www.diabetesatlas.org\(1\)](http://www.diabetesatlas.org(1)).

### 1.1 Como pode a dieta hiperlipídica induzir a resistência à insulina?

Para fins de entendimento sobre como funciona o mecanismo de entrada de glicose na célula, partimos do pressuposto de que indivíduos magros possuem a sinalização intracelular da insulina em condições normais. Por sua vez, para que ocorra a entrada de glicose e outros nutrientes na célula, é necessário que ocorra a interação da insulina ao seu receptor específico, que gera uma cascata de sinalização e a autofosforilação do receptor de insulina em resíduos de tirosina no interior de suas células-alvo <sup>13</sup>. As mudanças conformacionais das subunidades  $\alpha/\beta$ , e o recebimento de grupamentos fosfato em sua estrutura são reconhecidos pelo substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), que ativa a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). A PI3k então age sobre os fosfolipídios de membrana, estimulando PDK-1, que se torna uma quinase e passa a agir sobre a proteína serina/treonina quinase B (AKT), uma proteína integradora de sinais dentro da célula. Quando ativa, a AKT estimula a translocação de transportador de glicose-4 (GLUT-4) para a membrana das células musculares e adiposas, o que permite a

entrada de glicose para o interior do citoplasma, para assim exercer sua função imunometabólica <sup>14</sup> (figura 2A).

Figura 2. (A) Via de sinalização da insulina e translocação de GLUT-4 em condições normais. (B) Mecanismos de redução na via de sinalização insulínica.



Fonte: adaptado de Lehninger, “Principles of Biochemistry”, 6th edition (2014)

Entretanto, a partir do momento em que o excesso de peso passa a contribuir com o desenvolvimento de RI, disfunções dos tecidos sensíveis a insulina tornam-se

evidenciadas e associadas a ingestão de alimentos com alto conteúdo lipídico e de carboidratos<sup>15</sup> (figura 2B). Dessa forma, excessivos picos de insulina na circulação estão relacionados à dificuldade que este hormônio encontra em cumprir seu papel primário de transportar a glicose sanguínea para o interior das células<sup>13</sup>. Sua consequência a longo prazo, somada a elevação da taxa da lipólise a fim de regular o metabolismo e o aumento dos níveis de ácidos graxos livres (AGL), é a falha da própria via de sinalização insulínica, prejudicando a captação de glicose principalmente no tecido adiposo (TA) e no musculoesquelético (ME)<sup>16</sup>.

No fígado, apesar da captação de glicose ser independente da ação da insulina, tanto a glicogênese como a lipogênese são dependentes deste hormônio, além própria inibição da produção hepática de glicose (PHG)<sup>17</sup>. Nesse sentido, a intolerância à glicose somada aos prejuízos na sensibilidade à insulina pelos tecidos-alvo acarreta uma disfunção celular e sistêmica, que traz consigo a consequente exaustão das células-β das ilhotas pancreáticas a continuarem liberando altas doses de insulina<sup>18</sup>. Sustentado tal quadro por um determinado intervalo de tempo, verificam-se prejuízos da normoglicemia, fazendo com que os níveis de glicose plasmática passem a permanecer também elevados, apesar de reversíveis através do tratamento farmacológico<sup>19</sup> e/ou mudança do estilo de vida<sup>20</sup>. Quando configurada a hiperglicemia de jejum, de forma crônica o indivíduo tende a desenvolver DM2<sup>21</sup>.

## **1.2 Inflamação nos tecidos sensíveis à insulina: o papel da imunidade**

Complicações relacionadas a obesidade induzida pela ingestão predominante de dietas hiperlipídicas (DH) levam ao aumento do acúmulo de gordura total e peso corporal, além da redução da sensibilidade à insulina conforme já explicado acima<sup>22</sup>. O excesso de glicose é então armazenado no tecido adiposo branco (TAB) em forma de lipídios e no fígado como glicogênio, junto da possibilidade de reconversão novamente em glicose durante períodos de aumento da demanda energética (por exemplo, em função do aumento do nível de atividade física)<sup>23</sup>. Entretanto, a hipertrofia do TA gera uma disfunção do metabolismo da glicose e dos AGL, e uma das primeiras respostas do sistema imune nesse contexto condiz com a mobilização de células de origem mieloide como, por exemplo, por meio do aumento da infiltração e polarização macrófagos no TAB<sup>24</sup>.

Macrófagos adaptam-se em seu tecido residente às circunstâncias locais e exercem inúmeras funções efetoras, como fagocitose e produção de citocinas. No estado obeso, ocorre a ativação dos macrófagos residentes no TAB (MTAB) e no fígado (células de Kupffer), compreendidas como os principais mecanismos da regulação da meta-inflamação a nível tecidual a fim de manter a homeostase <sup>25</sup>. Com isso, a medida que ocorre a exacerbação da inflamação no TAB, o grau de apoptose celular aumenta neste tecido, formando estruturas parecidas com coroas (crown-like) nos adipócitos inflamados, no intuito de realizar o tamponamento lipídico <sup>26</sup>.

Em paralelo, ocorre aumento da liberação de polipeptídios, denominados de citocinas, e que exercem ação pró-inflamatória pelos MTAB (também chamadas de adipocinas quando liberadas por neste tecido), como por exemplo: fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12 e a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), que acabam por atrair ainda mais células imunes. Funcionalmente, esses macrófagos infiltrados são polarizados com o fenótipo M1 (genes Cd11c+ e F4/80), e estão presentes na maioria das doenças e condições de cunho inflamatório, como aterosclerose, esteatose hepática, e artrite reumatoide, por exemplo <sup>26</sup>. No TA, o aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 é capaz de prejudicar a sensibilidade à insulina deste órgão. Ambas são secretadas basicamente por macrófagos e células T, e estimulam a fosforilação de IRS-1 em seus resíduos de serina (ser307), em vez da fosforilação em tirosina, refletindo a tolerância à glicose <sup>27</sup>.

Por outro lado, existem mecanismos reguladores impulsionados também por macrófagos, mas desta vez com a finalidade protetora contra o dano tecidual. Essa via é denominada de polarização em sentido M2, ou via alternativa, que possui propriedade anti-inflamatória (em geral, vista por meio dos genes Cd11c- e Mgl1+). Com isso, emerge sua potente competência fagocítica, removendo células apoptóticas e promovendo reparação tecidual <sup>23</sup>. Desta forma, propriedades pró-angiogênicas e imunoregulatórias do fenótipo M2 são geralmente descritas em experimentos que se propõem a testar intervenções com o intuito de amenizar a inflamação associada a obesidade e demais doenças crônicas, como no caso do exercício físico, por exemplo <sup>28</sup>. Em geral, as células M2 participam das respostas de Th2, atenuam a meta-inflamação e orquestram a promoção do remodelamento tecidual. O aumento da ação anti-inflamatória pode ser visto pelo aumento da liberação de IL-4, IL-5, IL-10, IL-1ra e IL-13, por exemplo <sup>28; 29</sup>.

Contextualizando, quando a obesidade induzida por DH promove o aumento do fenótipo M1, isso acaba desregulando o equilíbrio entre a razão M1:M2 <sup>30</sup>. Nesse sentido,

existe a necessidade da implementação de ferramentas farmacológicas e/ou não-farmacológicas no intuito de reverter o estado inflamatório subclínico<sup>29; 31</sup>. Pesquisas têm buscado entender como a supressão da meta-inflamação possa ser administrada, seja por meio da biotecnologia para modificação da expressão gênica em modelos de intervenção pré-clínicos, ou por meio da mudança do estilo de vida, que primariamente envolve estratégias de cunho nutricional e aumento do nível de atividade física, que modulam o sistema imune objetivando atenuar a inflamação tecidual mediada pelo TA e fígado, restabelecendo o equilíbrio M1:M2, assim como a redução da hipertrofia dos adipócitos e atenuação da RI de indivíduos obesos<sup>28; 32</sup>.

O recrutamento de macrófagos exposto até aqui compõe a linha de defesa inerente ao sistema imune inato, eficaz na sinalização de patógenos e na resposta inflamatória<sup>33; 34</sup>. Num segundo momento, entra em ação o sistema imune adaptativo, que age sobretudo através das células T, competentes para reconhecer, sinalizar e destruir os agentes considerados nocivos ao nosso organismo<sup>35</sup>, e que muitas vezes atua conjuntamente a polarização e infiltração de macrófagos, fundamental para a apresentação de antígenos celulares, propriedade que ambas as células possuem para sinalizar a necessidade de uma resposta imune específica<sup>36; 37</sup>. Além disso, o sistema imune adaptativo possui uma resposta celular mediada, ao qual está muito bem descrito o papel das células B, responsáveis por aumentar a produção e liberação de anticorpos a partir de patógenos estranhos que ativam vias sinalização inflamatória no nosso corpo. Quando ativadas, células B iniciam seu processo de proliferação e diferenciação, que culmina na geração de plasmócitos com produção de imunoglobulinas com alta afinidade para o epítipo antigênico que originou a resposta<sup>40</sup>.

Estas células possuem potente propriedade quimiotática voltada para a migração de células efetoras do sistema imune, e são recentes as evidências sobre seu papel na modulação da RI<sup>38; 39; 40</sup>. Além disso, não encontramos até o presente momento evidências sobre o comportamento das células B diante do exercício físico. No cenário da meta-inflamação, Jason DeFuria et al.<sup>41</sup> verificaram que uma composição aumentada destas células também é uma característica do TAB na obesidade. Esse fato, quando verificado em camundongos obesos alimentados com DH, mostrou que o recrutamento de células B pode promover a ativação de células T CD4+ que, por sua vez, potencializam a polarização de macrófagos tipo M1, resultando no agravamento da RI. Por outro lado, foi visto que a depleção genética das células B evita os efeitos da inflamação do TAB

causado pela DH, promove melhora da sensibilidade à insulina e induz a quimiotaxia de macrófagos <sup>42</sup>.

### **1.3 Efeitos do exercício físico na resistência à insulina e inflamação**

É bem documentado que o exercício físico regular é considerado como ferramenta não-farmacológica para a prevenção e tratamento da obesidade, DM2 e demais distúrbios cardiometabólicos, principalmente por não estar associada aos importantes efeitos colaterais que podem ocorrer com tratamentos exclusivamente farmacológicos <sup>43</sup>. Nesse sentido, Ropelle e colaboradores <sup>44</sup> demonstraram que mesmo uma sessão aeróbica isolada de exercício de natação de baixa intensidade e longa duração já seria capaz de reverter a cascata de sinalização inflamatória e a ativação de JNK em animais com obesidade induzida por DH. Em outro estudo, foi observado que exercício físico foi capaz de reduzir a inflamação no ME, TAB e no fígado, mediado pela via de receptores do tipo *toll-4* (TLR-4), o que culminou na melhora da sensibilidade à insulina em ratos com obesidade induzida por DH. Essa diminuição da ativação do TLR-4 induzida pelo exercício em ratos alimentados com dieta rica em gordura foi intimamente associada à ativação reduzida da c-Jun N-terminal kinases (JNK) <sup>32</sup>.

De fato, o exercício físico é amplamente utilizado para fins de redução do peso corporal e do nível de adiposidade <sup>45</sup>. Entretanto, não está bem descrito na literatura que tais adaptações estejam presentes em curto prazo <sup>46</sup>. Ainda assim, amplos benefícios do exercício desde uma única sessão se mostram presentes, como por exemplo: na redução dos marcadores inflamatórios liberados pelos tecidos-alvo da insulina, e aumento da captação de glicose estimulada pela contração muscular, mesmo da presença de intolerância à glicose ou DM2 avançada <sup>47</sup>. A contração muscular também proporciona a translocação de GLUT-4 no TA e no ME, independentemente da ação da insulina <sup>48</sup>. Tal aumento da expressão gênica de GLUT-4 está diretamente relacionado com maior captação de glicose e maior sensibilidade do receptor de insulina, inclusive nos adipócitos <sup>49</sup>.

O mecanismo acima descrito pode ser explicado através da sinalização da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) que, quando mediada pelo exercício físico, pode otimizar a captação de glicose no ME e TA independente de insulina <sup>50</sup>. Conforme já mencionado, a translocação de GLUT-4 por meio da via da insulina ocorre através da ação de PI3K-AKT <sup>51</sup>. Entretanto, nos casos em que a obesidade prejudica a

via da sinalização regular da insulina, o exercício se mostra eficaz por restaurar os mecanismos de tolerância à glicose <sup>9</sup>. Isso ocorre porque a AMPK é uma molécula reguladora da homeostasia metabólica intracelular, ou seja, a contração muscular e o estado de hipóxia durante o exercício consomem boa parte da energia disponível em adenosina trifosfato (ATP). Durante o esforço físico isso ocorre de maneira cumulativa ao aumento da disponibilidade de adenosina difosfato (ADP), que é transformado em adenosina monofosfato (AMP) por ação da enzima adenilato ciclase, mecanismo suficiente para ativar a AMPK, a fim de controlar o metabolismo celular. Além disso, a ativação da AMPK por meio do exercício inibe a formação de ATP advinda do metabolismo dos lipídeos, considerado mecanismo regulatório de proteção do organismo contra depleção energética severa, o que culmina na regulação do metabolismo da glicose através da glicólise, oxidação de AGL e biogênese mitocondrial <sup>48</sup>. Por fim, a AMPK exerce efeitos no TA, inibindo a síntese de ácidos graxos e a lipólise, e no fígado, que inibe a produção de ácidos graxos e colesterol <sup>52</sup>. Tomados em conjunto, tais mecanismos contribuem para que a o ME seja o principal regulador do metabolismo da glicose e AGL, o que faz do exercício uma terapia não-farmacológica para controle da RI/DM2 <sup>47</sup>.

Bradley e colaboradores <sup>28</sup> já haviam relatado que o exercício voluntário em roda, por sua vez melhora a sensibilidade à insulina e a inflamação do TA em camundongos obesos, pois mitiga os efeitos prejudiciais da DH, como por exemplo prevenindo ganhos adicionais de peso, redução da inflamação e a possibilidade de reverter a RI. Depois, foi verificado que o aumento da liberação de IL-10 durante a prática de exercícios de natação com intensidade moderada em camundongos reduz o fenótipo M1 e aumenta o fenótipo M2, uma vez que houve diminuição da expressão dos genes de TNF- $\alpha$  e IL-2 e da via de sinalização inflamatória de IKK- $\beta$ /NF- $\kappa$ B <sup>32; 53; 54</sup>. A literatura oferece evidências de que a reversão dos efeitos inflamatórios seja decorrentes da ativação de receptores ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR)- $\alpha/\gamma$ , que parecem ter correlação indireta com as vias de sinalização pró-inflamatórias e do dano tecidual, dada sua ação que resulta na redução de proteínas quinases ligadas ao mecanismo pró-inflamatório, assim como ocorre na atenuação da sinalização de JNK, por exemplo <sup>28; 55</sup>.

#### **1.4 Leucotrieno B4 como marcador inflamatório da resistência à insulina induzida pela obesidade**

Diante das descobertas que mostraram o desenvolvimento da RI induzida pela obesidade e sua relação com a inflamação subclínica, pesquisadores atentaram-se para os

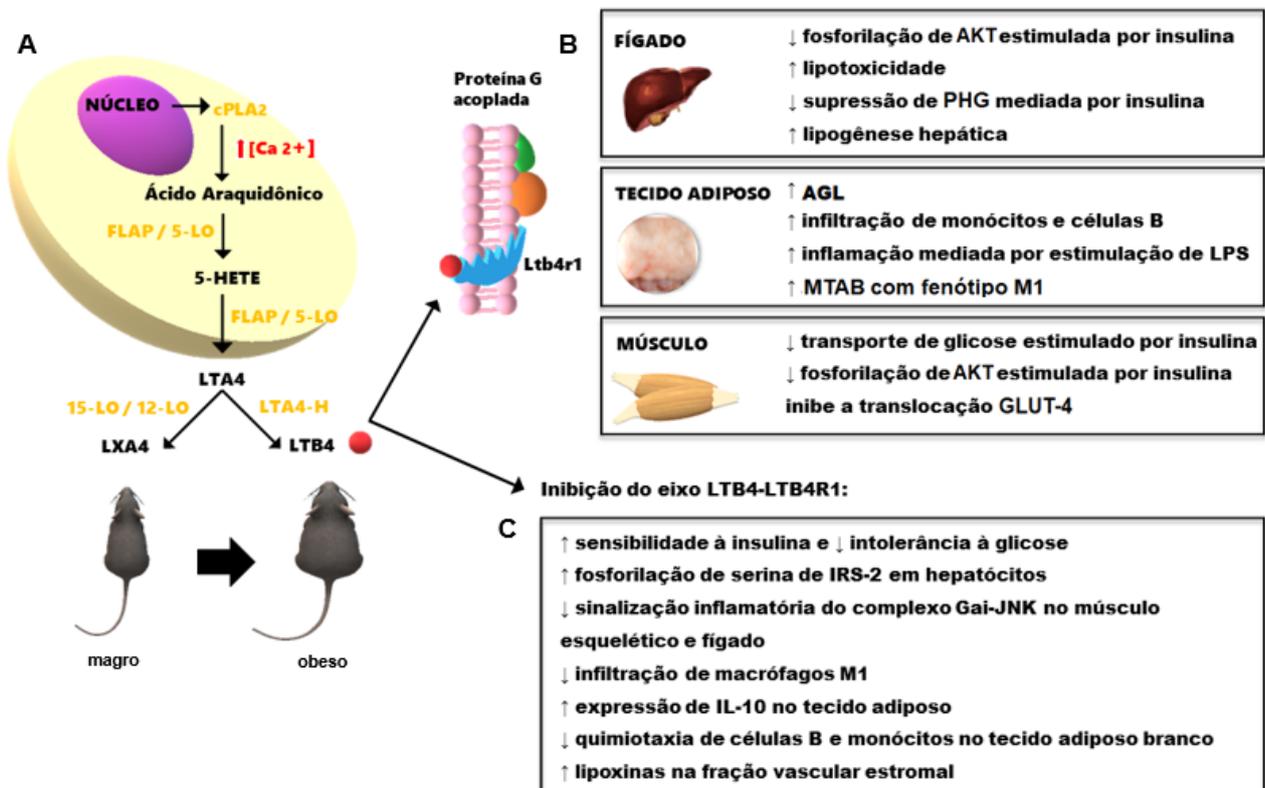
possíveis mecanismos moleculares em comum envolvidos nessa questão. Desde então, evidências apontaram moléculas provenientes da síntese dos eicosanoides uma clara relação entre disfunções do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos e a resposta inflamatória <sup>56</sup>. Nesse sentido, um mediador lipídico denominado leucotrieno B4 (LTB4) se mostrou eficiente para assinalar a presença de citocinas pró-inflamatórias e a perda da sensibilidade à insulina ligada a obesidade <sup>57</sup>.

Apesar de originalmente o LTB4 estar relacionada a inflamação presente no contexto da asma brônquica <sup>58</sup>, sua utilização como mediador da RI se deve ao fato do LTB4 possuir receptores de alta afinidade acoplados a proteína G também nos tecidos-alvo da insulina, estes denominados de LTB4R1 e LTB4R2, passando a exercer efeitos robustos que levam a infiltração de células imunes e regula a produção de citocinas no fígado, TA e ME <sup>57; 59</sup>. Outrossim, o aumento do recrutamento e ativação de macrófagos M1 acompanha os níveis aumentados de LTB4, em decorrência da alimentação rica em gordura. Conseqüentemente, ocorre aumento da translocação da proteína NF-κB em macrófagos, diminuição da fosforilação da via PI3K-AKT em resposta à insulina, e redução da translocação do GLUT-4. Desta forma, o surgimento da RI mostrou associado relação direta com o aumento da expressão de LTB4 e LTB4R1 <sup>60</sup>.

A família dos leucotrienos caracteriza espécies de mediadores lipídicos endógenos que servem como indicadores pró-inflamatórios. São gerados a partir da liberação do ácido araquidônico por meio da ação da fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) associado ao aumento de cálcio intracelular. Isso leva a expressão da 5-lipoxigenase (5-LO) em todas as células de origem mieloide, que se translocam para a membrana nuclear, e passam a exercer efeitos junto da ação da proteína ativadora do 5-LO âncora de membrana (FLAP) <sup>31</sup>. Ambas 5-LO e FLAP levam a formação do ácido 5-hidroperoxyeicosatetraenoico (5-HETE), que por sua vez, dão origem à formação do leucotrieno A4 (LTA4), rapidamente convertido em LTB4 pela ação da enzima LTA4 hidrolase (LTA4-H), conforme detalhado na figura 3A <sup>61</sup>. Em roedores magros, o LTA4 pode originar o aumento da expressão de LXA4, uma lipoxina que deriva de LTA4 quando esta pretere a produção de LTB4 em adipócitos e sua fração vascular estromal (SVF). O tratamento com lipoxinas em animais transgênicos demonstrou aumentar a produção de LXA4 ao invés do aumento da expressão de LTB4, sem alterar os níveis séricos de colesterol LDL e AGL. Em suma, o bloqueio de LTA4-hidrolase, enzima que transforma LTA4 em LTB4, medeia efeitos anti-inflamatórios causados pelo aumento da expressão de LXA4 <sup>62</sup>.

Contudo, a ligação entre LTB4 e o receptor LTB4R1 nos tecidos-alvo à ação da insulina tem sido amplamente pesquisada no âmbito da inflamação associada a RI nos tecidos sensíveis a ação da insulina (figura 3B). Mudanças conformacionais nas subunidades da proteína G são as principais responsáveis pelos efeitos inflamatórios derivados do eixo LTB4-LTB4R1<sup>38</sup>. Li et al. (2015), deixaram claro que este eixo possui relação direta com a promoção da RI em camundongos obesos<sup>63</sup>. Sua ativação é responsável pelo acúmulo de inflamação tecidual relacionada a hipertrofia do TAB causada pelo desenvolvimento de sobrepeso em decorrência da DH<sup>64</sup>, e mais importante: inicialmente, ele foi reconhecido pela capacidade de recrutar células efetoras de origem mieloide, servindo como fator quimiotático indutor de infiltração de monócitos, neutrófilos, e macrófagos residentes polarizados em sentido M1, isto é, sua ativação promove o deslocamento e migração de células que aumentam e favorecem o dano celular e a inflamação sistêmica<sup>65</sup>.

**Figura 3. (A) síntese de LTB4 em animais magros e com obesidade induzida pela DH. (B) Ação do LTB4 junto ao seu receptor de alta afinidade (LTB4R1) acoplado a proteína G, localizado no fígado, tecido adiposo e músculo em função da obesidade. (C) Efeitos da inibição farmacológica e depleção gênica do eixo LTB4-LTB4R1.**



Fonte: traduzido e adaptado de “The Role of LTB4 in Obesity-Induced Insulin Resistance Development: An Overview”<sup>66</sup>

Entretanto, o LTB4 também exerce efeitos além daqueles verificados no TAB. O tratamento com LTB4 em miócitos L6 prejudicou o transporte de glicose e a fosforilação de AKT estimulados pela insulina, e diminuiu a translocação de GLUT-4 também nessas células. Em hepatócitos, o LTB4 promove diretamente a PHG e pode atenuar a capacidade a função fisiológica da insulina em inibir esse aspecto do metabolismo hepático. Isso levou à análise dos efeitos da depleção gênica alcançada em animais *knockout* (KO) para LTB4R1 (LTB4R1KO) e as alterações na sensibilidade à insulina após o tratamento com o próprio LTB4, que ainda assim induziram a RI *in vivo*, mesmo em animais LTB4R1KO. Num segundo momento, esses resultados foram comparados a utilização de um fármaco inibidor de LTB4R1 (CP105696) que, após 14 semanas de DH de camundongos C57BL, indicou restauração da sensibilidade à insulina durante análises de clamp-hiperinsulinêmico-euglicêmico. Os mesmos autores ainda assinalaram que a modulação da resposta inflamatória induzida pelo eixo LTB4-LTB4R1 foi mediada pelo complexo formado pelo receptor ligado a proteína G (G $\alpha$ i) e JNK (G $\alpha$ i-JNK), uma vez que tanto o inibidor farmacológico de JNK quanto o de G $\alpha$ i resultaram no mesmo efeito verificado em LTB4R1KO, ou seja, em inibir o efeito do LTB4 em ambos os tecidos <sup>63</sup>. Adicionalmente, o inibidor de LTB4R1 bloqueou a ativação de JNK inclusive quando induzida por lipopolissacarídeo (LPS), reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, particularmente interferons-gamma (IFN- $\gamma$ ) e IL-6, assim como a redução de MCP-1; IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF- $\alpha$  pelo tecido adiposo epididimal (epi-TAB) <sup>11</sup>, conforme verificado na figura 3C.

Wei Ying et al.,<sup>42</sup> num estudo conduzido com diversas linhagens de camundongos, isolaram células B de animais *wide-type* (WT) em cultura de células marcadas com corante fluorescente, e então transplantaram essas células tanto em camundongos magros quanto obesos WT tratados com DH. A análise via citometria de fluxo revelou aumento significativo do recrutamento de células B marcadas para o TAB no grupo obeso em comparação aos roedores magros, consistente com aumento dos níveis de LTB4. Entretanto, os mesmos autores ainda analisaram o recrutamento de células B em camundongos LTB4R1KO e, como esperado, não houve quimiotaxia. O aumento dos níveis de LTB4 foi acompanhado pelos outros marcadores inflamatórios (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) o que leva a crer que a ligação entre o LTB4-LTB4R1 esteja diretamente ligada com a inflamação no TAB e posterior RI neste tecido. Neste sentido, posterior análise do TAB de animais tratados com DH que possuem mutação que anula o desenvolvimento de

células B, revelou que o LTB4R1 ativo é quem regula o recrutamento de células B transplantadas *in vivo*, inclusive o aumento da resposta Th1 (através do aumento de IFN- $\gamma$ ) e do fenótipo M1 de macrófagos. Por conseguinte, foi verificada a ação de anticorpos-T, que melhorou a sensibilidade à insulina; porém, a depleção de células T não anulou completamente a resposta de LTB4 no mesmo grau em que o tratamento com clodronato, fármaco utilizado como inibidor da infiltração de células da imunidade inata. Curiosamente, o tratamento combinado entre LTB4 e clodronato não revelou uma resposta inflamatória superior àquela verificada somente por meio do clodronato. Portanto, os autores concluíram que os efeitos adversos das células B no metabolismo da glicose são parcialmente dependentes dos macrófagos, por meio de mecanismos adicionais que são independentes das células B e T. Por fim, foi verificado que ação voluntária dos macrófagos junto ao recrutamento de células B se deve ao aumento da produção de LTB4 pelos próprios adipócitos.

Entretanto, cabe ressaltar que até o momento não há evidências sobre o aumento do fenótipo M2 nesse contexto<sup>67</sup>. Esse fato aproxima a ideia de que o exercício físico possa ser usado como estratégia para bloquear a inflamação causada pelo eixo LTB4-LTB4R1, através de seus efeitos anti-inflamatórios. Desta forma, entendemos que a inibição do LTB4R1, por atuar nesses mesmos tecidos em que o exercício se mostra eficaz no tratamento da meta-inflamação, poderia também sofrer alguma influência do exercício físico. Além disso, como já discutido até aqui, já é bem estabelecido o papel do exercício em reduzir a infiltração de monócitos e macrófagos polarizados em sentido M1, além de reduzir a própria resposta inflamatória Th1<sup>40</sup>. Por fim, o treinamento físico é capaz de aumentar a polarização de macrófagos M2, restaurando o equilíbrio da razão M1/M2, e melhorando a saúde metabólica<sup>68</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA

A realização deste trabalho está baseada em achados que corroboram ao entendimento de que o exercício aeróbio pode diminuir os níveis de inflamação e RI no contexto da obesidade induzida por DH em meio experimental, contextualizando o aumento dos níveis de atividade física como fator para promoção da saúde e tratamento das doenças crônicas, sobretudo a obesidade. Está bem estabelecida na literatura a relação direta entre o efeito do exercício físico e o controle da inflamação associada a melhora da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose em animais obesos. Nesse sentido, postulamos compreender sobre mecanismos inflamatórios ainda não explorados, através da influência que o exercício pode exercer no eixo LTB4-LTB4R1, nunca antes explorado para tal fim.

Apesar das evidências sobre seu papel do LTB4 como marcador da inflamação na presença da obesidade e RI induzida pela DH, até a realização do presente projeto ainda não haviam relatos sobre a possível influência do exercício físico na expressão gênica ou via de sinalização dos receptores de LTB4 (LTB4R1). Complementarmente, ainda não existem evidências sobre como o exercício modula o recrutamento de células B e antígenos específicos no contexto do tratamento da obesidade e da RI. Como a função do LTB4 tem sido destacadamente relacionada a modulação das células B, postulamos que este trabalho possa facilitar a realização de novos estudos em que o exercício poderia funcionar como um marcador da imunidade mediada (celular).

A utilização do exercício agudo em nosso trabalho se mostra fundamental para o entendimento isolado da influência exercício físico, afastando outras adaptações que o treinamento pode resultar no tratamento da obesidade como, por exemplo, melhorando a composição corporal e reduzindo o percentual de gordura. O aumento da massa magra e redução da massa adiposa certamente seriam efeitos indiretos do exercício sobre o metabolismo de glicose e também sobre a inflamação, ou seja, ambos serão efeitos esperados e relacionados ao treinamento crônico, também incluído no presente projeto.

### 3. OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do exercício físico agudo e do exercício crônico na expressão do receptor-1 do leucotrieno B4 (LTB4R1) em camundongos *Swiss* com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

#### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito do exercício físico na expressão gênica de LTB4R1 em fígado, músculo e tecido adiposo.

- Investigar o efeito do exercício físico nas respostas inflamatórias envolvidas com a via LTB4/LTB4R1 (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-4) em fígado, músculo e tecido adiposo.

- Investigar a repercussão do exercício físico na via de sinalização e homeostase da insulina no tecido adiposo, fígado e músculo esquelético.

- Investigar o efeito do exercício físico na intolerância à glicose e insulina sistêmicas.

- Investigar a repercussão do exercício físico no peso corporal dos animais.

#### 4. MATERIAS E MÉTODOS

**Animais e dieta.** Para os experimentos do presente trabalho foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Ao atingirem 6 semanas de idade os animais foram inicialmente divididos em 2 grupos: animais controle (CTL) alimentados com ração padrão para roedores, e animais alimentados com dieta hiperlipídica. Após 12 semanas de dieta hiperlipídica os animais do grupo dieta hiperlipídica foram subdivididos em 3 novos grupos: animais obesos sedentários (DH), animais exercitados cronicamente (4 semanas) (DH+EC) e animais exercitados agudamente (DH+EA). A dieta hiperlipídica consistiu na seguinte distribuição entre os macronutrientes: 55% das calorias provenientes de gordura, 29% de carboidrato e 16% de proteína (Tabelas 1, 2 e 3). Entre a décima e a décima segunda semana de administração de DH, foram realizados os testes de glicemia em jejum, seguido dos testes de intolerância intraperitoneal à insulina (ITT) e a glicose (GTT) para determinar se houve a instalação da RI. Durante todo o processo experimental os animais foram mantidos em no máximo 5 animais por gaiola, numa sala do laboratório de biodinâmica com cerca de no máximo 60 animais e com exaustão do ar permanente. Além disso, a temperatura se manteve constante, e o ciclo de claro e escuro foi de 12 em 12 horas. Todos os animais tinham alimentação e água (bebedouro) *ad libitum*.

**Tabela 1:** Composição da dieta hiperlipídica

<b>DIETA HIPERLIPÍDICA</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Banha de porco	312g
Caseína	200g
Amido Dextrinado	132g
Amido de Milho	115,5g
Sacarose	100g
Celulose Microcristalina	50g
Óleo de Soja	40ml
Mix de Minerais (Mistura)	35g
Mix de Vitaminas	10g
L-Cistina	3g
Bitartarato de Colina	2,5g
<b>TOTAL</b>	<b>1 Kg</b>

**Tabela 2:** Mistura de sais minerais da dieta

<b>MIX DE MINERAIS</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Carbonato de Cálcio Anidro	357
Fosfato de Potássio Monobásico	196
Citrato de Potássio Tribásico Monohidratado	70,78
Cloreto de Sódio	74
Sulfato de Potássio	46,6
Óxido de Magnésio	24
Citrato Férrico	6,06
Carbonato de Zinco	1,65
Carbonato Manganoso	0,63
Carbonato Cúprico	0,3
Iodato de Potássio	0,01
Selenato de Sódio Anidro	0,01025
Paramobilidato de Amônio 4H <sub>2</sub> O	0,00795
Meta-Silicato de Sódio 12H <sub>2</sub> O	1,45
Sulfato de Crômio e Potássio 12H <sub>2</sub> O	0,275
Cloreto de Lítio	0,0174
Ácido Bórico	0,0815
Fluoreto de Sódio	0,0635
Carbonato de Níquel	0,0318
Vanato de Amônio	0,0066
Sacarose	221,026
<b>TOTAL</b>	<b>1 Kg</b>

**Tabela 3:** Descrição das vitaminas contidas na dieta

<b>MIX DE VITAMINAS</b>	
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Ac Nicotínico	12g
Piridoxina	2,6g
Riboflavina	2,4g
Biotina	0,06g
Manitol	9,99g
Vit A	1,6g
Vit K	0,3g
Pantotenato Cálcio	6,4g
Tiamina	2,4g
Ac Fólico	0,6g
Vit B12	0,01g
Vit E 500UI/g	60g
Vit D3	0,01g
Lactose	qsp 110g
<b>TOTAL</b>	<b>110g</b>

**Protocolo de exercício físico agudo:** Conforme descrito anteriormente <sup>69</sup>, camundongos obesos adultos foram aclimatados a nadar por 10 min em dois dias consecutivos,

colocados no tanque de natação com água até o nível do peito. Até oito animais nadaram juntos em recipientes plásticos com 35 cm de largura, 51 cm de comprimento, 32 cm de profundidade com água à 25 cm da capacidade total, com temperatura da água mantida em aproximadamente 34°C. Os animais nadaram durante quatro períodos de 30 min, com períodos de descanso de 5 min, para um tempo total de natação de 2 horas. Após o protocolo de exercício agudo realizado pelos animais DH+EA, foi oferecida alimentação *ad libitum* por 2 horas, sendo que os alimentos foram retirados para jejum de 6 horas antes da análise, totalizando oito horas após o protocolo de exercício.

**Protocolo de exercício físico crônico.** Conforme descrito anteriormente <sup>70</sup>, para adaptação ao exercício de natação, os animais foram inseridos ao meio líquido durante 10 minutos por 2 dias consecutivos. Os animais obesos (DH+EC), em grupo de no máximo cinco animais, assim nadaram em recipientes plásticos de 35 cm de largura, 51 cm de comprimento, 32 cm de profundidade com água à 25 cm da capacidade total, com temperatura da água mantida em aproximadamente 34°C, durante 1 hora, 5 dias por semana, durante 4 semanas, suportando uma carga progressivamente aumentada de 1% a 4% do peso corporal, que foi ajustada semanalmente, de acordo com o peso do animal na semana.

**Testes de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT) e à glicose (GTT).** Os testes foram realizados após a execução dos respectivos protocolos de exercícios físicos. O período de jejum foi de seis horas antes dos testes e a primeira coleta de sangue será registrada como tempo 0 do teste. Após isso, para o teste de tolerância intraperitoneal a insulina (ITT), a insulina (1,5U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica. A velocidade constante do decaimento da glicose (kITT) foi calculada usando da fórmula  $0,693/t_{1/2}$ . Calculou-se o  $t_{1/2}$  da glicose a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear. O teste de tolerância intraperitoneal a glicose (GTT) foi realizado em jejum. Após coleta sangue de uma amostra não desafiada (tempo 0), uma solução de 20% de glicose (2.0g/kg peso corporal) foi administrada dentro da cavidade peritoneal. Para determinar a concentração da glicose do soro, amostras de sangue foram coletadas da cauda em 30, 60, 90 e 120 minutos, medida por um método colorimétrico utilizando-se um monitor de glicose (Glucometer; Bayer).

**Extração de Tecidos.** Os animais permaneceram em jejum por 6 horas antes da extração de tecidos. Sob efeito anestésico previamente descrito <sup>71</sup>, os camundongos foram anestesiados com injeção de 350µl cetamina 10% (100 mg / ml; Medistar, Ascheberg, Alemanha), 300µl xilazina 2% (20 mg / ml; Riemsler, Greifswald, Alemanha) e 300µl de solução salina 0,09%, combinados em uma única seringa de insulina. Os camundongos foram contidos manualmente e 300µl da mistura anestésica foram injetados intraperitonealmente no quadrante inferior direito do abdômen, usando uma agulha de calibre 25, independentemente do peso corporal de cada camundongo. Após abolição do reflexo corneano e a retirada da pata à dor, a cavidade abdominal de cada animal foi aberta para a exposição da veia porta, pela qual foi injetado 0,2ml de solução salina, com ou sem a presença de insulina ( $10^{-6}\text{mol.l}^{-1}$ ). Após 30 segundos da injeção de insulina, uma secção do fígado foi então retirada. Após mais 60 segundos (total de 90 segundos), fragmentos de tecido adiposo epididimal, fígado e do músculo gastrocnêmio foram então coletados. Todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e guardadas em biofreezer (-80°C) para análises posteriores.

**Extração de RNA e Proteínas.** Os tecidos foram picados grosseiramente e homogeneizados imediatamente em TRIZOL (Invitrogen), para obtenção de RNA; ou em um tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 mM vanadato de sódio, 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. A homogeneização dos TAB e fígado ocorreu através de um Tissue-Lyser (QIAGEN) ajustado na frequência de 30/s por 3 minutos. O ME foi homogeneizado por meio do uso de um Polytron (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA), operado em máxima velocidade por 30 segundos. Em todas as amostras com tampão de extração de proteínas foi adicionado Triton X-100 1% e as mesmas permaneceram no gelo por 40 minutos. O material extraído foi então centrifugado na velocidade de 11000 rpm por 40 minutos a 4°C, para remover o material insolúvel, utilizando-se o sobrenadante para as etapas seguintes: uma parte foi utilizada para determinar a concentração proteica de cada amostra pelo método colorimétrico de biureto e outra parte utilizada para avaliação do extrato total, ou seja, separação das proteínas em SDS-PAGE, com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, em proporção de 5:1, mantido sempre a 4°C até o momento de submeter à fervura a 100°C durante 5 minutos. As técnicas de imunoprecipitação e imunoblot serão descritas a seguir.

**Anticorpos e Reagentes de rotina.** Todos os anticorpos foram provenientes das marcas: Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA), Cell Signaling Technology (Beverly, MA) ou ABCAM (Cambridge, MA). A tabela 1 descreve a lista de anticorpos utilizados. Os reagentes de rotina do laboratório foram comprados da Sigma Chemical (St. Louis, MO).

**Tabela 4:** Descrição dos anticorpos.

<b>Anticorpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Código</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Anticorpo secundário</b>
AKT	Cell Signaling	8685	60kDa	Rabbit
Beta-Actina	Cell Signaling	4967	45kDa	Rabbit
F4/80	Santa Cruz	sc-26642	160kDa	Goat
IKK	Santa Cruz	sc-34673	75kDa	Goat
IL-10	Abcam	ab9969	17kDa	Rabbit
IL-1beta	Cell Signaling	8689	17kDa	Rabbit
IR-beta	Santa Cruz	sc-711	86kDa	Rabbit
JNK	Santa Cruz	sc-1648	43kDa	Mouse
MCP-1	Santa Cruz	sc-28879	17kDa	Rabbit
p-AKT	Santa Cruz	sc-7985R	55kDa	Rabbit
p-IKK	Santa Cruz	sc-23470	87kDa	Rabbit
p-IR-beta	Santa Cruz	sc-25103R	95kDa	Rabbit
p-JNK	Santa Cruz	sc-6254	48kDa	Mouse
TNF-alpha	Cell Signaling	1347	19kDa	Goat

**Análise Proteica por Immunoblotting.** Os precipitados obtidos, após serem ressuspendidos em tampão de Laemmli 107 contendo DTT 100mM e aquecidos em água fervente por 5 minutos, foram submetidos a eletroforese com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), o gel será balizado por marcador de alto peso molecular da BioRad. A eletroforese será realizada em cuba de minigel da BioRad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE sempre submetido a 40 volts inicialmente até a passagem pela fase de empilhamento (stacking) e 120 volts até o final do gel de resolução (resolving). A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da BioRad por 90 minutos a 120 volts. As membranas com as proteínas transferidas foram

então incubadas em solução bloqueadora (BSA 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween-20 0,02%) por duas horas a temperatura ambiente a fim de diminuir a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana de nitrocelulose. Após lavadas em solução basal, estas membranas foram incubadas com anticorpos específicos de interesse do projeto, e mantidas a 4°C, overnight, sob agitação contínua. Em seguida as membranas foram novamente lavadas com solução basal e as proteínas específicas de interesse foram identificadas através de anticorpos secundários específicos e quimiluminescência em membranas de nitrocelulose. As imagens das bandas foram obtidas através de foto documentadora (BioRad) e analisadas através de densitometria óptica. A partir de então foi realizada a análise dos dados, comparando-se o tecido do animal controle com o animal em dieta, e posteriormente ao animal exercitado, de forma que sempre haverá controle intra-experimento.

#### **RT-PCR em Tempo Real para avaliação de LTB4R1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2 e IL-4.**

O kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade com inibidor de RNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) foi usado para sintetizar cDNA de fita simples (2 $\mu$ l de 10x RT Buffer, 0,8 $\mu$ l de DNTP Mix, 2 $\mu$ l de 10x RT Random Prime, 1 $\mu$ l Multiscript, 1 $\mu$ l RNase Inhibitor, e 3,2 $\mu$ l de água desionizada), por meio de TaqMan® Gene Expression MasterMix. Todos os instrumentos e reagentes foram adquiridos da Life Technologies. Após diluição desejada, utilizou-se o kit qPCRBIO Probe Mix (0,033 $\mu$ L de Rox para cada 1  $\mu$ L de qPCRBIO Probe Mix No-Rox), somado a quantidade total de MasterMix usando sondas de primers TaqMan® específicos de genes da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Na placa de 96 poços, a cada 2,25  $\mu$ l da amostra diluída, acrescenta-se 2,75  $\mu$ L da mistura MasterMix/ TaqMan®, resultando um volume total de 5  $\mu$ l. A RT-PCR em Tempo Real foi realizada em duplicatas no termociclador QuantStudio6 (Thermo Fisher Scientific), e os valores de expressão gênica relativa foram avaliados com o método  $2^{\Delta CT}$  usando snRNA U6 como de referência <sup>72</sup>. As condições qRT-PCR foram definidas de acordo com as recomendações do fabricante: 10min, 95°C, 40 ciclos (15seg 95°C, 1min 60°C) com leitura de fluorescência durante a etapa de anelamento <sup>73</sup>. Foi selecionado como marcador endógeno de estabilização o gene GAPDH.

**Tabela 5:** descrição dos primers utilizados:

<b>Gene</b>	<b>Código</b>	<b>Fluoróforo</b>
GAPDH	MouseGAPDH4352339E-1009033	VIC
LTB4R1	Mm00521839_M1	FAM
TNF- $\alpha$	Mm00443258_M1	FAM
IL-1 $\beta$	Mm00434228_M1	FAM
CCL-2	Mm00441242_M1	FAM
IL-4	Mm00445259_M1	FAM

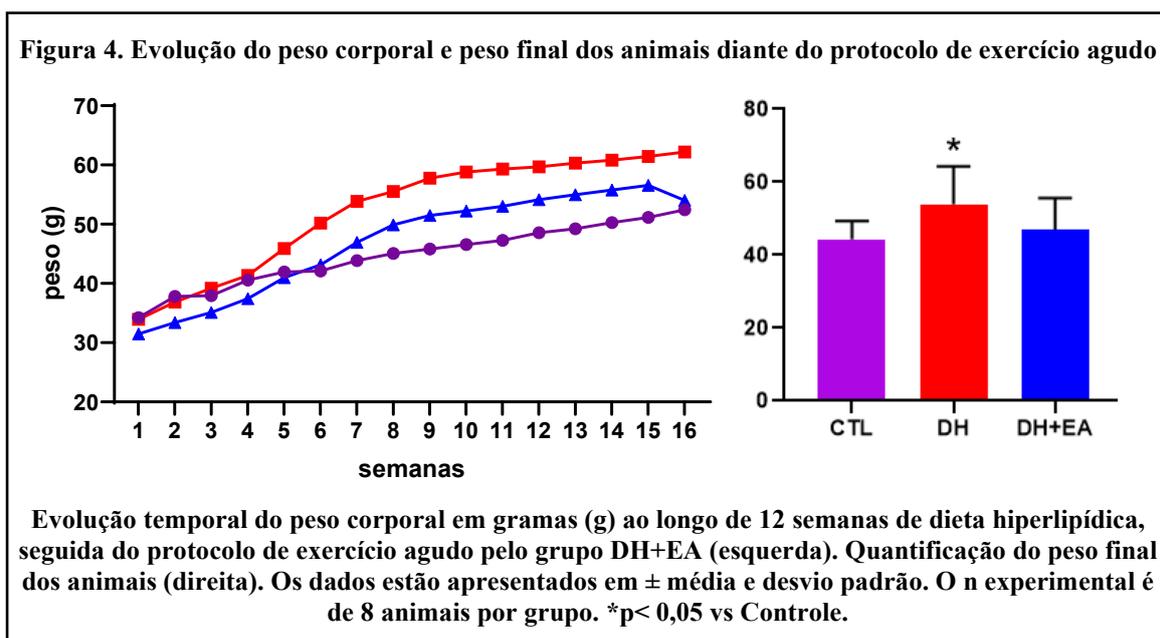
**Análises Estatísticas.** Os dados foram expressos como médias  $\pm$  desvio-padrão da média, sendo indicado o número de experimentos independentes. Para análise estatística, os grupos serão comparados utilizando análise de variância de um fator ou dois (ANOVA), de acordo com a necessidade. Uma vez encontrado diferenças estatísticas significantes, será aplicado o pós-teste de Bonferroni. O nível de significância adotado será de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 RESPOSTAS DO PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO

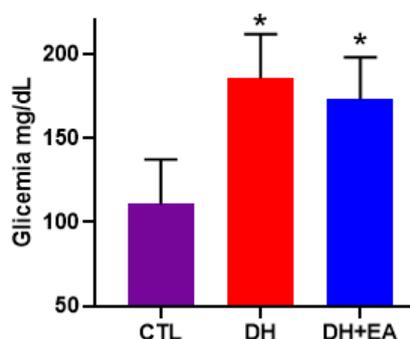
#### 5.1.1 Caracterização da obesidade e resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica

A Figura 4 mostra a evolução do peso corporal do grupo controle (CTL), assim como dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica durante doze semanas (DH e DH+EA). Na décima quinta semana de intervenção, foi aplicado única sessão de exercício agudo de natação no grupo DH+EA. Todos os demais grupos permaneceram em comportamento sedentário durante todo o experimento. Conforme demonstrado, o grupo DH obteve ganho significativo de peso corporal ao final da intervenção quando comparado ao grupo CTL, alimentado com dieta padrão para roedores. Houve redução dos valores de média de peso corporal do grupo de animais uma única sessão de natação (DH+EA). Entretanto, não houve redução significativa do peso corporal nos animais agudamente exercitados.



Diante da expectativa de que uma única sessão de exercício pudesse levar a atenuação dos efeitos da resistência sistêmica à insulina, foram realizados os seguintes testes a fim de constatar a medida indireta da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina: glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT). Conforme demonstrado na Figura 5, a glicemia de jejum dos animais obesos pertencentes aos grupos DH e DH+EA foi significativamente maior em comparação ao grupo controle.

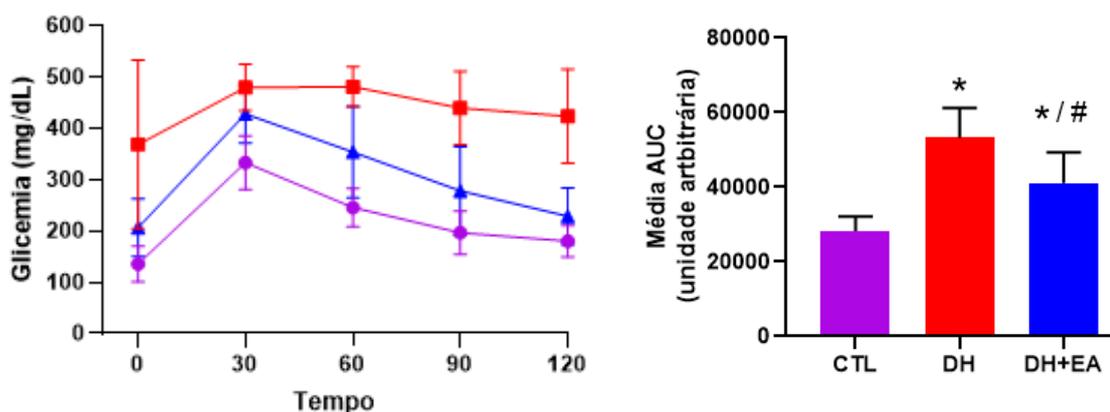
Figura 5. Resultados da medição de glicose sérica em relação ao protocolo de exercício agudo



Glicemia de jejum (8 horas) dos animais após 5 horas da sessão de exercício físico agudo em animais DH+EA. Os dados estão apresentados em  $\pm$  média e desvio padrão. O n experimental é de 7 a 8 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs controle e #  $P < 0,05$  DH.

Conforme mostrado na Figura 6, doze semanas de dieta hiperlipídica foram capazes de promover intolerância à glicose nos grupos DH e DH+EA em comparação ao grupo alimentado com dieta padrão (CTL). É possível verificar diferenças qualitativas entre os tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos que compõem o GTT, que revela substanciais aumentos dos valores de glicemia do grupo DH em relação ao grupo CTL, assim como atenuação da intolerância à glicose por meio de uma única sessão de exercício. A análise

Figura 6. Teste de tolerância à glicose (GTT) diante do protocolo de exercício agudo

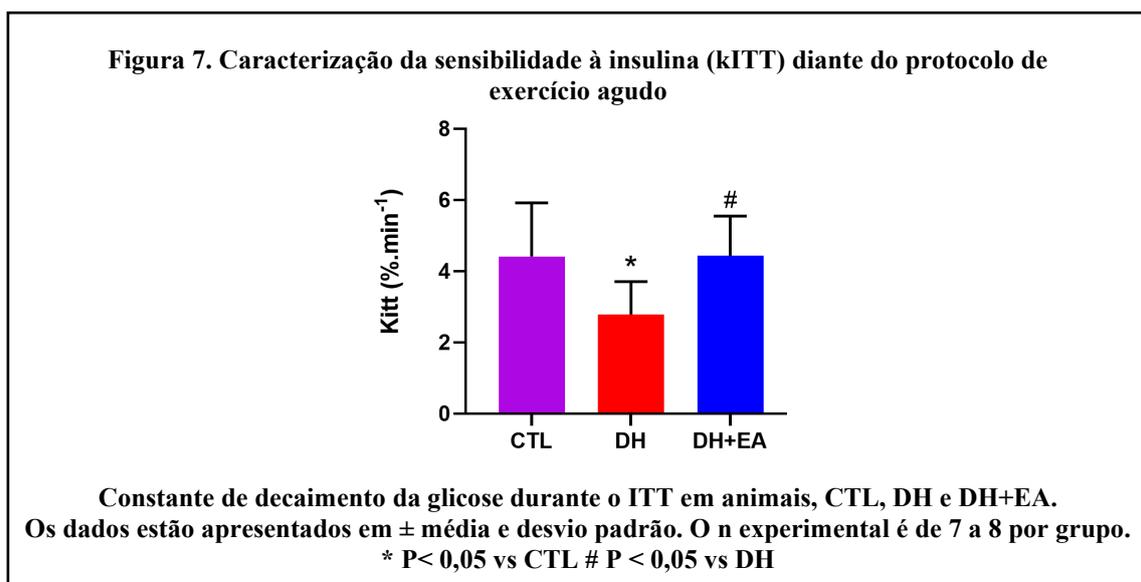


Valores de média da glicemia do GTT ao final da 16ª semana após sessão de exercício físico agudo, em animais dos grupos CTL, DH e DH+EA (esquerda). Valores de média em relação a área sob a curva (AUC) após GTT (direita). Os dados estão apresentados em  $\pm$  média e desvio padrão. O n experimental é de 7 a 8 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs controle e #  $P < 0,05$  DH.

da área sob a curva (AUC), confirmou-se a eficácia da DH em induzir a intolerância à glicose de forma significativa. Por sua vez, o exercício conferiu melhora significativa da AUC em uma única sessão de exercício de natação (grupo DH+EA). Diante do exposto,

esses dados indicam que o exercício físico agudo foi capaz de reverter a intolerância à glicose provocada pela alimentação rica em gordura.

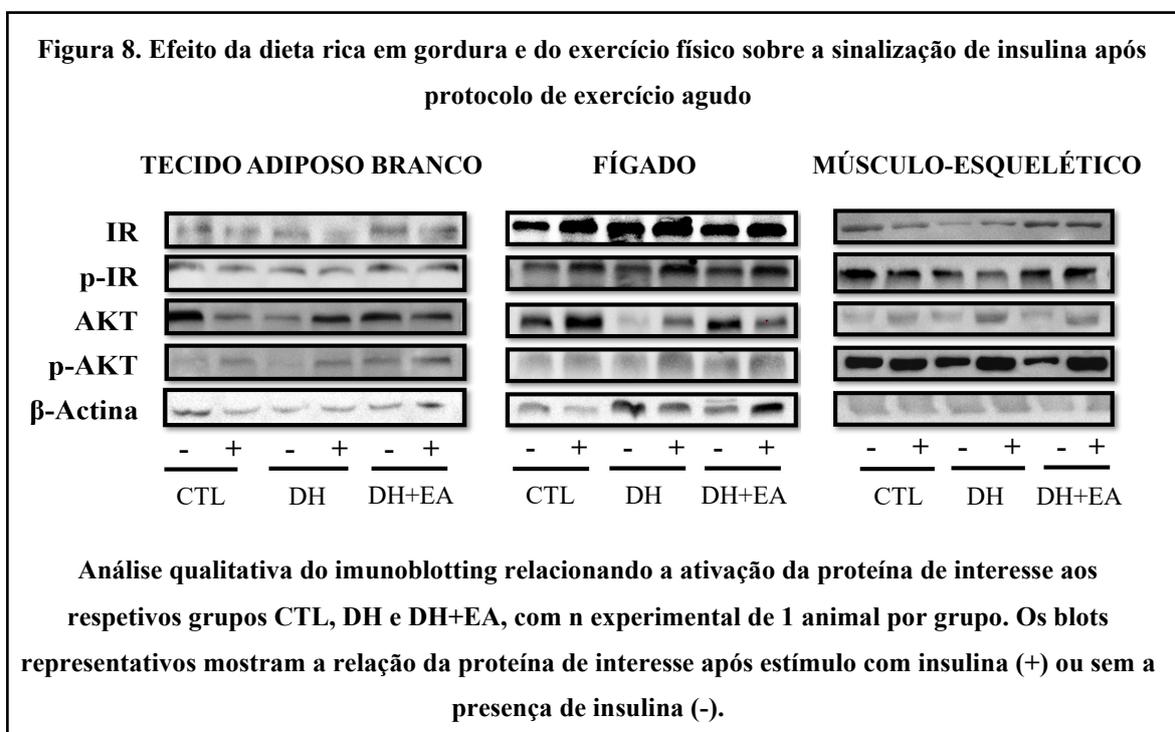
Ainda, foi possível calcular a constante de decaimento da glicose (kITT) através dos valores de glicemia obtidos durante o ITT. Os resultados mostram que a dieta rica em gordura foi capaz de reduzir significativamente o kITT quando comparado aos resultados obtidos nos animais alimentados com dieta padrão para roedores, traduzindo potente perda da sensibilidade à insulina no grupo DH. Mais uma vez, uma única sessão de exercício físico de natação de intensidade moderada e prolongada duração foi suficiente para promover incremento robusto do kITT em animais alimentados com a dieta rica em gordura (Figura 7). Os valores de média obtida nos animais exercitados foram semelhantes àqueles verificados pelo grupo CTL, não havendo diferença estatística entre eles. Tal resultado indica normalização da tolerância à insulina nos animais tratados com DH após o exercício.



### 5.1.2 Respostas do exercício físico na via de sinalização da insulina e homeostase da glicose

Na etapa subsequente do presente trabalho, realizamos a análise a nível tecidual da sinalização da insulina e da homeostase da glicose. No TAB, em relação a subunidade  $\beta$  do receptor de insulina (IR- $\beta$ ), não conseguimos observar diferença importante na fosforilação do animal DH em relação ao CTL (Figura 8, esquerda). Contudo, ao desafiar os animais exercitados (DH+EA), verificamos aumento acentuado da fosforilação do IR- $\beta$  em relação ao grupo sedentário sob o mesmo regime alimentar. Por outro lado, quando avaliamos a AKT, observamos o mesmo comportamento nos grupos

(CTL, DH e DH+EA). No fígado, não foram observadas diferenças importantes na ativação das proteínas entre os grupos DH e CTL, assim como em relação ao protocolo de exercício agudo (Figura 8, centro).

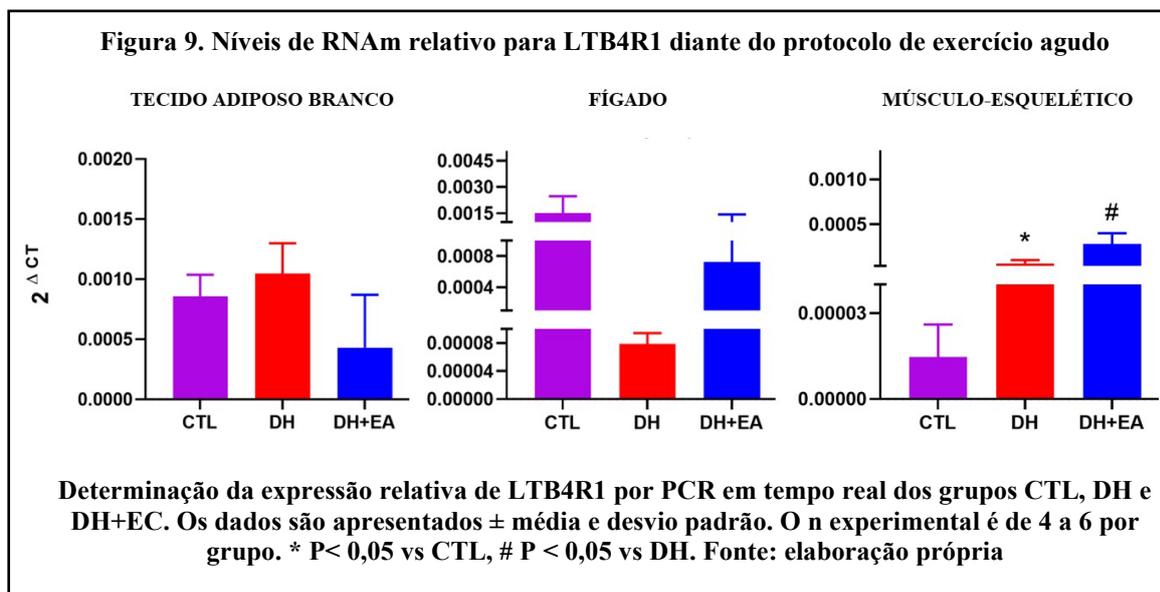


Por fim, investigamos a sinalização de insulina no tecido muscular esquelético. Quando estimulados com insulina, os animais do grupo DH apresentaram redução na fosforilação de IR-β e AKT, quando comparados aos animais CTL (Figura 8, direita). Entretanto, o grupo DH+EA foi capaz de melhorar a fosforilação das duas proteínas de interesse quando comparados com o grupo DH (Figura 8), e apresentar maior grau de ativação tanto na fosforilação de IR-β como na fosforilação de AKT.

### 5.1.3 Efeitos do exercício físico agudo na expressão gênica do LTB4R1

No presente trabalho, a expressão do RNAm, obtida através da técnica quantitativa de RT-PCR em tempo real, foi demonstrada através dos valores de 2x o valor elevado da diferença entre o limiar de ciclos (CT) necessários para quantificar o aumento da expressão do gene de interesse (mostrado através de  $2^{\Delta CT}$ ). Apesar da hipótese de que doze semanas de DH fossem suficientes para aumentar o RNAm de LTB4R1 no TAB, ME e fígado de animais obesos, não verificamos aumentos significativos da expressão de LTB4R1 do grupo DH no TAB e fígado em relação ao grupo CTL (Figura 9, centro e esquerda). Da mesma forma, não houve diferença estatística relevante em relação ao

exercício físico (DH+EA), que não alcançou diferenças importantes na expressão de LTB4R1 em relação ao grupo DH no TAB e fígado.

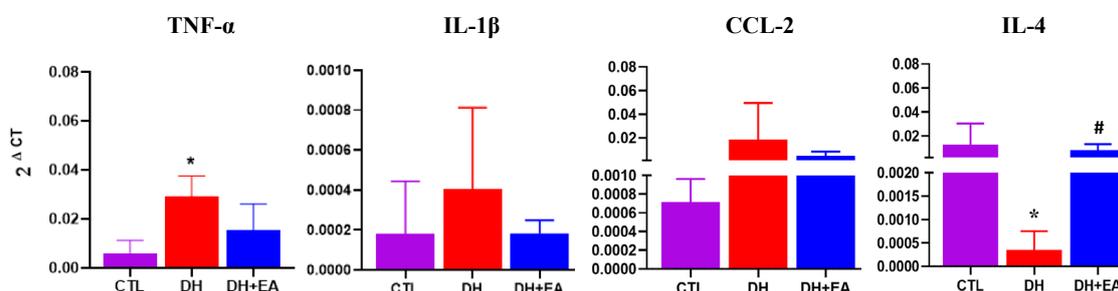


Contudo, somente no ME, a expressão de LTB4R1 foi significativamente maior no grupo DH em comparação aos animais magros alimentados com dieta padrão, conforme esperado. Curiosamente, o exercício agudo levou ao aumento significativo dos níveis de RNAm de LTB4R1 no ME em relação aos grupos CTL e DH (Figura 9, direita). Apesar do aumento da expressão de LTB4R1, diferente da hipótese inicial apresentada, percebemos que o exercício agudo levou a uma resposta inflamatória imediata no ME exercitado uma única vez.

#### 5.1.4 Expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido adiposo branco, fígado e músculo-esquelético

De maneira semelhante à forma como foi analisada a expressão gênica de LTB4R1, analisamos o RNAm das principais citocinas relacionadas com a expressão de LTB4 no TAB, fígado e ME. No TAB, conforme esperado e ilustrado na Figura 10, os níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores no grupo obeso sedentário e alimentado com DH em comparação ao grupo controle. Além disso, houve redução não significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  por meio do protocolo agudo de exercício físico aeróbico (DH+EA). Em relação a expressão de IL-1 $\beta$  e do ligante de quimiocina-2 (CCL-2), gene que codifica a expressão de MCP-1, não houve diferença estatística dos níveis de RNAm entre os grupos.

**Figura 10. Níveis de RNAm relativo das citocinas no TAB de camundongos obesos diante do protocolo de exercício agudo**

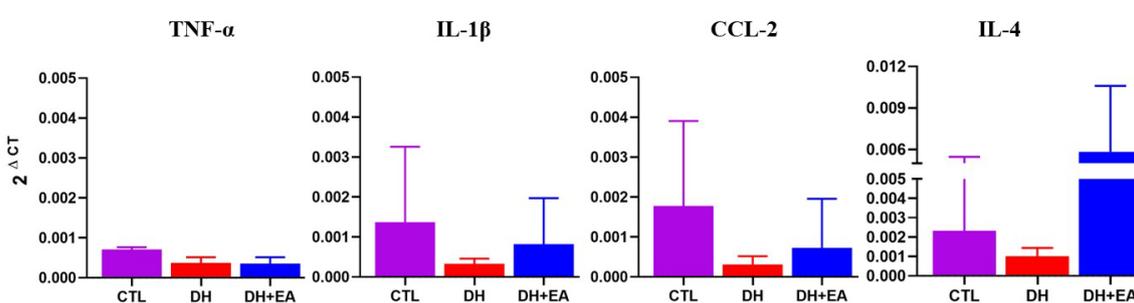


**Expressão relativa de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , CCL-2 e IL-4 por PCR em tempo real no TAB dos grupos CTL, DH e DH+EA. O n experimental é de 4 a 6 por grupo.**

**\* p<0,05% vs CTL e # p< 0,05% vs DH. Fonte: Elaboração Própria**

Diante da expressão gênica de IL-4, marcador anti-inflamatório que, em resposta ao exercício físico, poderia ser um indicador de melhora da inflamação tecidual. Conforme esperado, o grupo DH anotou níveis significativamente menores de RNAm quando em comparação ao grupo CTL. Além disso, uma única sessão de exercício aproximou os valores da expressão de IL-4 aos valores de normalização do grupo CTL, ou seja, houve aumento significativo da expressão de IL-4 no TAB dos animais exercitados uma única vez (DH+EA) em relação ao grupo obeso sedentário (DH) (Figura 10).

**Figura 11. Níveis de RNAm relativo das citocinas no fígado de camundongos obesos diante do protocolo de exercício agudo**

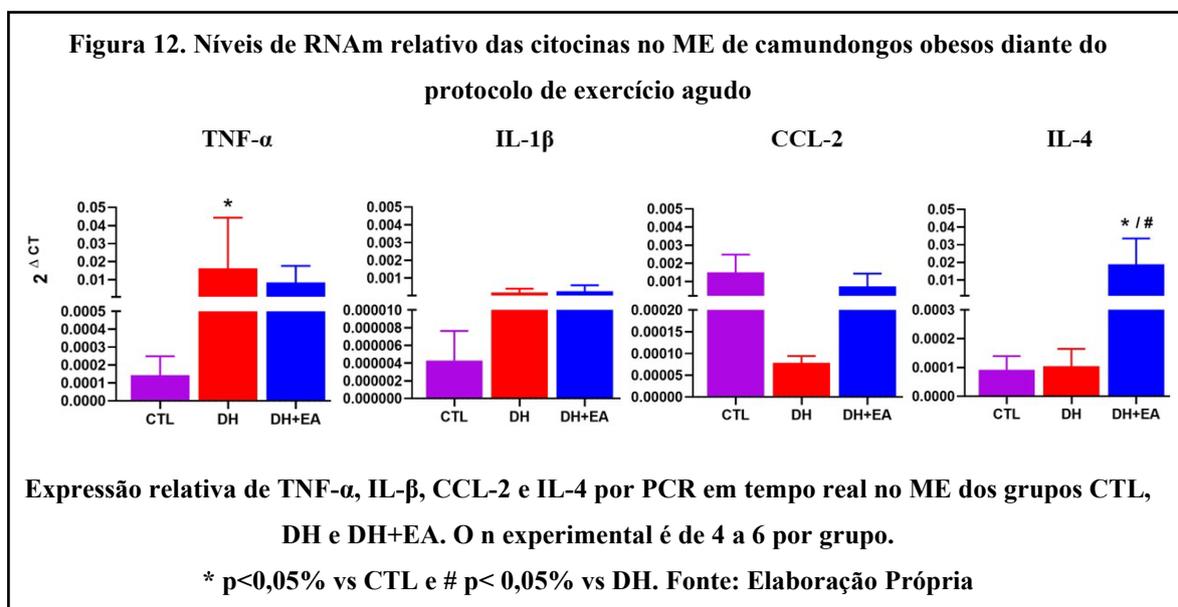


**Expressão relativa de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , CCL-2 e IL-4 por PCR em tempo real no Fígado dos grupos CTL, DH e DH+EA. O n experimental é de 4 a 6 por grupo.**

**\* p<0,05% vs CTL e # p< 0,05% vs DH. Fonte: Elaboração Própria**

Em relação a expressão gênica de citocinas no fígado (Figura 11), de maneira intrigante, não houve diferença significativa entre os níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  entre todos os grupos. Também não foram identificadas diferenças relevantes entre a expressão de IL-1 $\beta$  e CCL-2, ambas pró-inflamatórias, mesmo nos grupos tratados com dieta rica em gordura. No caso dos níveis anti-inflamatórios de IL-4, também não houve diferença significativa dos níveis de RNAm dentre os grupos.

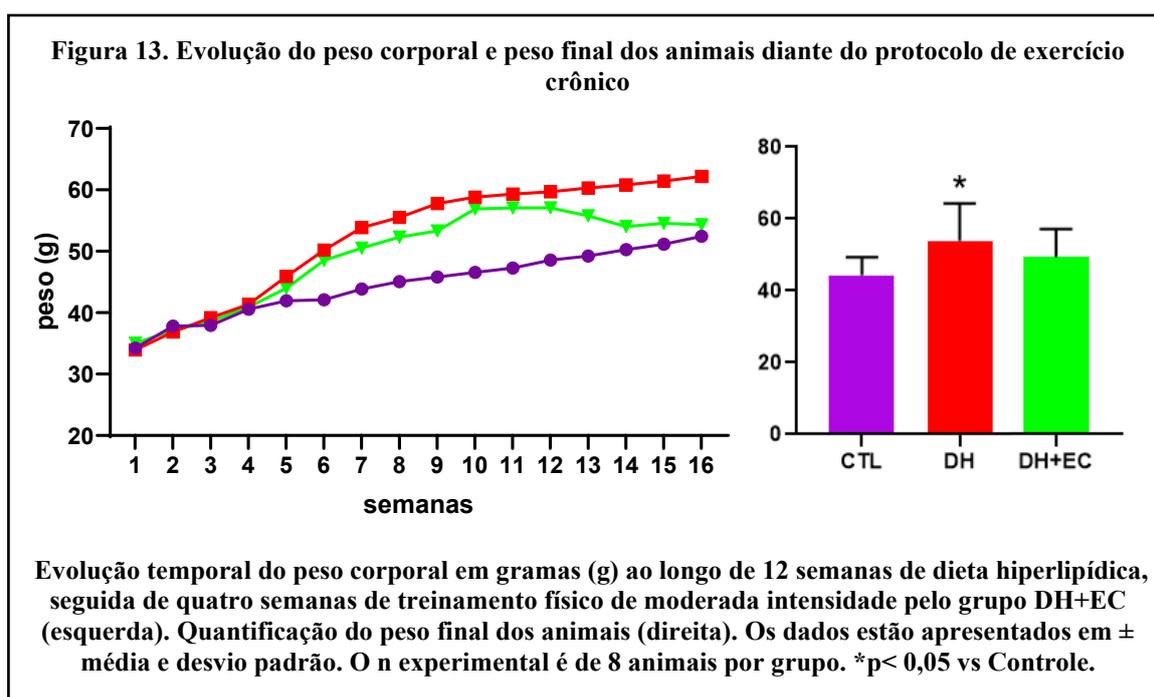
No ME, conforme mostrado na Figura 12, os níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores no grupo obeso sedentário e alimentado com DH em comparação ao grupo controle. Já em comparação aos grupos DH, não houve redução dos níveis de TNF- $\alpha$  após única sessão de exercício físico aeróbio. No caso de IL-1 $\beta$ , não houve diferença estatística entre os níveis de RNAm dos grupos analisados. No caso de CCL-2, não houve diferença estatística dos níveis de RNAm entre os grupos. De maneira inesperada, os níveis de RNAm do grupo controle, alimentado com dieta padrão para roedores, obteve valores de média superiores aos demais grupos alimentados com DH. Por fim, houve comportamento esperado da expressão gênica de IL-4, marcador anti-inflamatório que, em resposta ao exercício físico agudo (DH+EA), se mostrou como um indicador de melhora da inflamação tecidual, uma vez que seus níveis foram significativamente maiores em comparação ao grupo DH.



## 5.2 RESPOSTAS DO PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO CRÔNICO

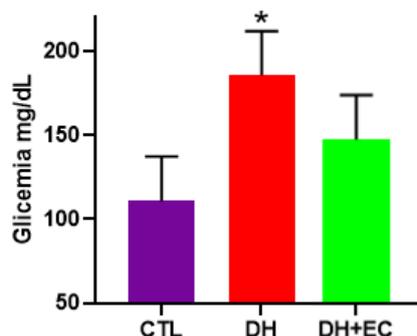
### 5.2.1 Caracterização da obesidade e resistência à insulina induzida pela dieta hiperlipídica diante do exercício crônico

Após doze semanas de dieta rica em gordura, animais do grupo DH+EC realizaram 4 semanas de treinamento físico de natação de moderada intensidade (entre a décima segunda semana e décima sexta semana de intervenção). Os animais do grupo CTL e DH permaneceram em comportamento sedentário durante todo experimento. Conforme demonstrado na Figura 13, o grupo alimentado com DH obteve ganho significativo de peso corporal ao final da intervenção quando comparado ao grupo CTL, alimentado com dieta padrão para roedores. Além disso, houve redução da média de peso corporal do grupo exercitado de forma crônica (DH+EC). Entretanto, essa redução significativa o peso corporal nos animais exercitados cronicamente. Contudo, quatro semanas de treinamento aeróbio de moderada intensidade não foi o suficiente para promover a redução significativa do peso corporal.



Assim como foi realizado no set experimental de exercício agudo, foram realizados os seguintes testes de glicemia de jejum, ITT e GTT a fim de constatar a medida indireta da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina. De acordo com o esperado, o exercício físico crônico foi capaz de reduzir a glicemia de jejum dos animais pertencentes ao grupo DH+EC, porém essa redução não foi significativa ao final do período total de intervenção (Figura 14).

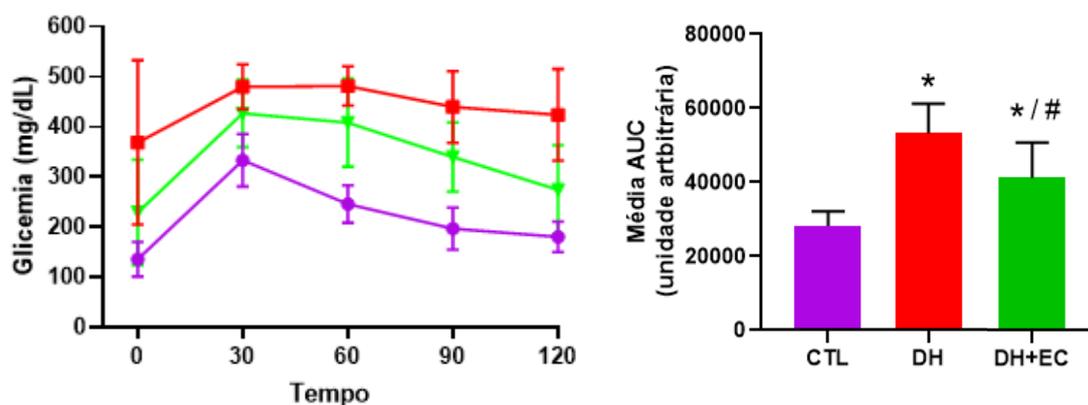
Figura 14. Resultados da medição de glicose sérica em relação ao protocolo de exercício crônico



Glicemia de jejum (8 horas) dos animais pertencentes aos grupos CTL, DH e DH+EC. Os dados estão apresentados em  $\pm$  média e desvio padrão. O n experimental é de 7 a 8 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs controle e #  $P < 0,05$  DH.

Conforme já descrito no item 5.1.1, a obesidade induzida por doze semanas de DH foi capaz de promover intolerância à glicose em ambos todos grupos alimentados com dieta rica em gordura em comparação ao grupo alimentado com dieta padrão. Entretanto, é possível verificar na figura 15 (lado esquerdo), que o grupo exercitado de forma crônica (DH+EC) apresentou uma redução dos valores de glicemia nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos que compõem o GTT. A análise de AUC (figura 15, lado direito) confirmou a intolerância à glicose pelo grupo DH, assim como melhora significativa da

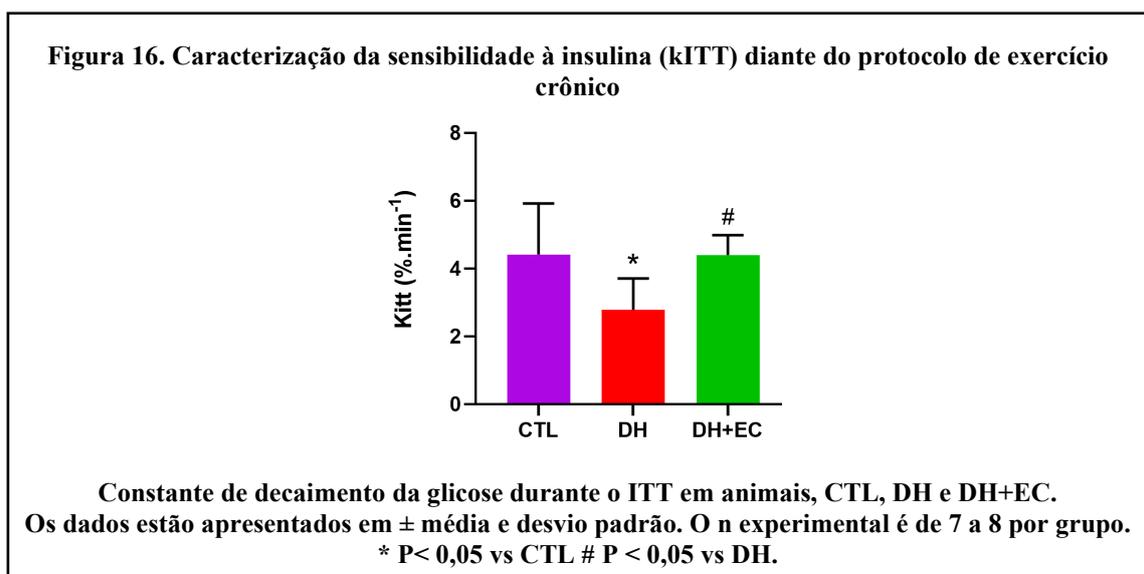
Figura 15. Teste de tolerância à glicose (GTT) diante do protocolo de exercício crônico



Valores de média da glicemia do GTT ao final da 16ª semana, após quatro semanas de exercício físico de natação, em animais dos grupos CTL, DH e DH+EC (esquerda). Valores de média em relação a área sob a curva (AUC) após GTT (direita). Os dados estão apresentados em  $\pm$  média e desvio padrão. O n experimental é de 7 a 8 animais por grupo. \*  $P < 0,05$  vs controle e #  $P < 0,05$  DH.

taxa de depuração da glicose após quatro semanas de treinamento aeróbio (grupo DH+EC). Como esperado, esses dados indicam que o exercício físico crônico foi capaz de atenuar a intolerância à glicose provocada pela alimentação rica em gordura.

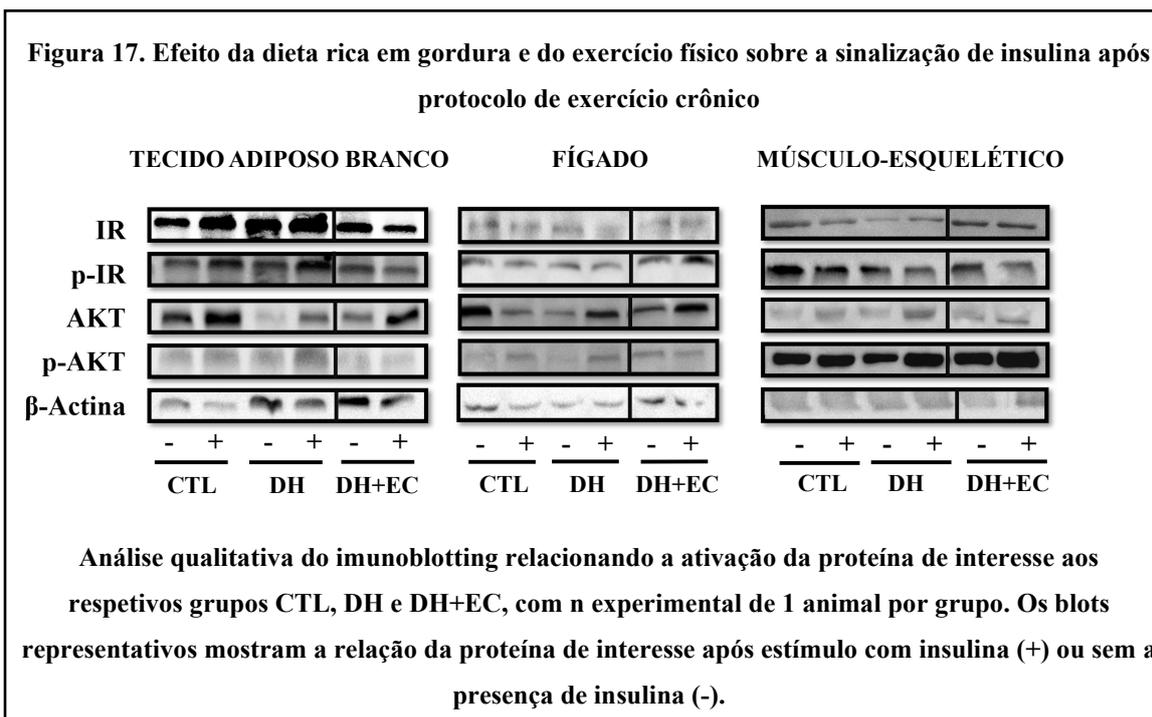
Por fim, diante dos valores de glicemia obtidos durante o ITT, foi verificado que a dieta rica em gordura foi capaz de reduzir significativamente o kITT quando comparado ao grupo CTL, o que reflete redução da sensibilidade à insulina pelos animais obesos (Figura 16). Em contraste, o treinamento aeróbio de quatro semanas foi eficaz em promover incremento robusto do kITT em animais alimentados com a dieta rica em gordura (Figura 16). Os valores de média obtida nos animais exercitados foram semelhantes àqueles verificados pelo grupo CTL, o que remete ao entendimento de que o exercício crônico restaurou a sensibilidade à insulina, mesmo na presença da dieta rica em gordura. Esses resultados indicam que os protocolos de exercício agudo e crônico promoveram importante melhora na tolerância à insulina nos animais tratados com DH.



### 5.2.2 Respostas do exercício físico na via de sinalização da insulina e homeostase da glicose

Assim como realizado no delineamento baseado nas respostas agudas do exercício físico, realizamos análises a nível tecidual da sinalização da insulina e da homeostase da glicose. Em relação a subunidade  $\beta$  do receptor de insulina (IR- $\beta$ ), não conseguimos observar diferença importante na fosforilação do animal DH em relação ao CTL no TAB, assim como em relação a fosforilação de AKT no mesmo tecido (Figura 17, esquerda).

Da mesma forma, após quatro semanas de exercício físico crônico (grupo DH+EC), não verificamos alterações contundentes na fosforilação IR- $\beta$ . Uma ligeira redução da fosforilação de AKT no grupo DH+EC leva a crer que o exercício físico crônico não exerceu efeitos locais sobre a sinalização da insulina no TAB (Figura 17, esquerda). Em seguida avaliamos a via de insulina no tecido hepático e não verificamos qualquer alteração contundente na fosforilação de IR- $\beta$  e de AKT entre todos os grupos analisados (Figura 17, centro).

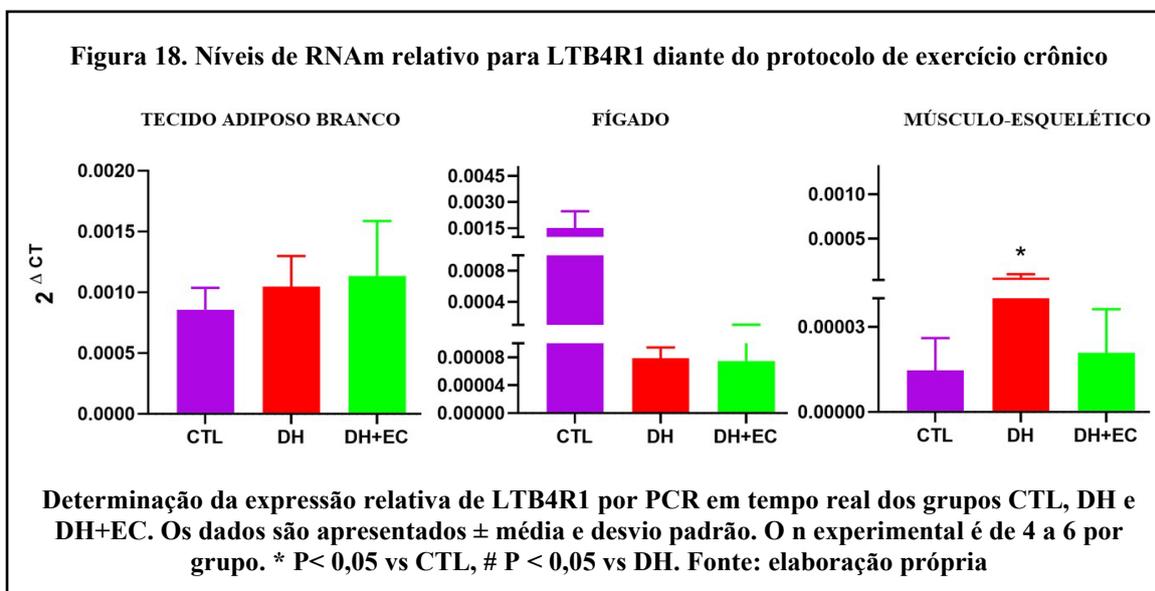


Por fim, investigamos a sinalização de insulina no tecido muscular esquelético. Quando estimulados com insulina, os animais do grupo DH apresentaram redução na fosforilação de IR- $\beta$  e AKT, quando comparados aos animais CTL. De forma intrigante, não verificamos diferenças no grau de ativação do IR- $\beta$  no grupo DH+EC. Por fim, houve efeito positivo para a fosforilação de AKT, que aumentou seu grau de ativação no grupo exercitado (Figura 17, direita) em comparação ao grupo obeso sedentário.

### 5.2.3 Efeitos do exercício físico crônico na expressão gênica do LTB4R1

De maneira semelhante ao que foi demonstrado anteriormente no item 5.1.3, não houve efeito da DH na expressão gênica de LTB4R1 no TAB e no fígado entre os grupos analisados. Foi verificado aumento significativo do RNAm de LTB4R1 no ME de animais submetidos a alimentação rica em gordura em comparação ao grupo alimentado

com dieta padrão para roedores (Figura 18, esquerda e centro). No que diz respeito aos efeitos do exercício crônico na expressão do receptor de LTB<sub>4</sub>, o grupo DH+EC obteve redução dos valores de média de  $2^{\Delta CT}$ , que indica atenuação da expressão de LTB<sub>4</sub>R1 em comparação ao grupo DH. Contudo, tais alterações não alcançaram relevância estatística em comparação ao grupo DH (Figura 18, direita).

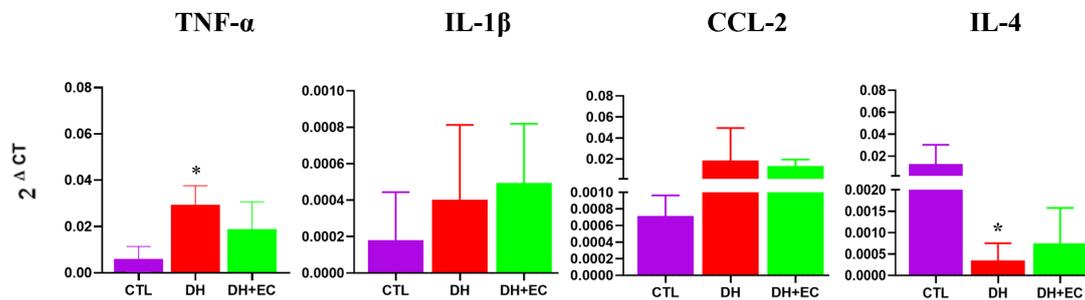


#### 5.2.4 Expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido adiposo, fígado e músculo-esquelético

Diante dos efeitos de quatro semanas de exercício de intensidade moderada, ilustrado na Figura 19, os níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  no TAB foram significativamente maiores no grupo obeso sedentário e alimentado com DH em comparação ao grupo controle. Além disso, houve redução não significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  após o período de treinamento (DH+EC). Não houveram diferenças significativas nos níveis de RNAm de IL-1 $\beta$  e CCL-2 entre os grupos. Contudo, os grupos alimentados com dieta rica em gordura (DH e DH+EC) apresentaram maiores níveis de RNAm quando em comparação ao grupo controle.

Por fim, foi verificada a expressão gênica de IL-4, marcador anti-inflamatório que, em resposta ao exercício físico, poderia ser um indicador de melhora da inflamação tecidual. Conforme esperado, o grupo DH anotou níveis significativamente menores de RNAm quando em comparação ao grupo CTL. O grupo exercitado cronicamente (DH+EC), embora tenha apresentado valores de média amostral maiores do que o grupo DH, não conseguiu aumentar significativamente os níveis de RNAm de IL-4 (Figura 19).

**Figura 19. Níveis de RNAm relativo das citocinas no TAB de camundongos obesos diante do protocolo de exercício crônico**

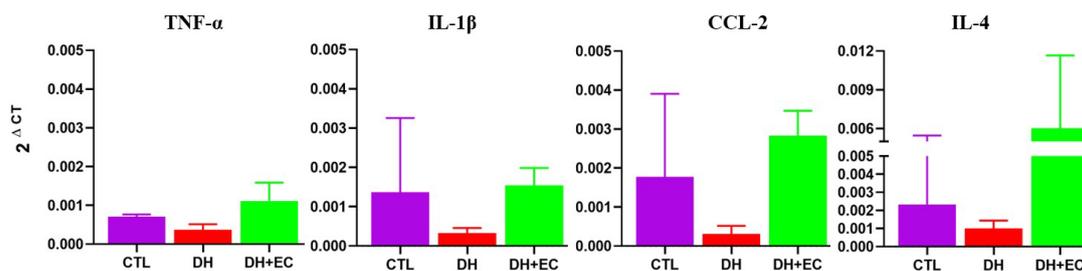


Expressão relativa de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , CCL-2 e IL-4 por PCR em tempo real no TAB dos grupos CTL, DH e DH+EC. O n experimental é de 4 a 6 por grupo.

\* p<0,05% vs CTL e # p< 0,05% vs DH. Fonte: Elaboração Própria

Em relação a expressão gênica de citocinas no fígado (Figura 20), de maneira intrigante, não houveram diferenças contundentes entre os níveis de RNAm entre todos os grupos de todas as citocinas analisadas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2 e IL-4). É possível verificar que os níveis de IL-4 apresentam aumento não significativo da expressão nos grupos exercitados (DH+EC) em comparação com o grupo alimentado com dieta rica em gordura e controle alimentado com dieta padrão.

**Figura 20. Níveis de RNAm relativo das citocinas no fígado de camundongos obesos diante do protocolo de exercício crônico**

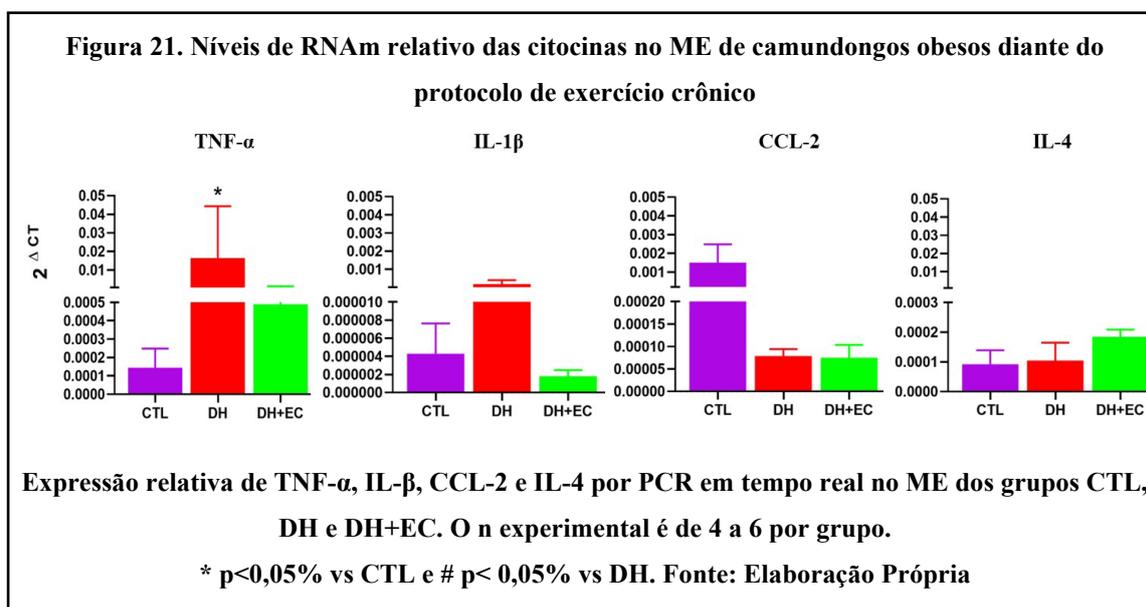


Expressão relativa de TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , CCL-2 e IL-4 por PCR em tempo real no fígado dos grupos CTL, DH e DH+EC. O n experimental é de 4 a 6 por grupo.

\* p<0,05% vs CTL e # p< 0,05% vs DH. Fonte: Elaboração Própria

No ME, conforme mostrado na figura 21, os níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores no grupo obeso sedentário e alimentado com DH em comparação ao grupo controle (CTL). Já em comparação aos grupos DH, houve redução

não significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  diante do protocolo de exercício físico crônico (DH+EC).



No caso de IL-1 $\beta$ , não houve diferença estatística entre os níveis de RNAm dos grupos analisados. É curioso analisar que a expressão de IL-1 $\beta$  no grupo exercitado de forma crônica (DH+EC) foi menor até mesmo do que os valores do nível de RNAm observados no grupo controle. No caso de CCL-2 e IL-4, não houve diferença estatística dos níveis de RNAm entre os grupos (Figura 21).

## 6. DISCUSSÃO

De acordo com o exposto pelo presente trabalho, verificamos a expressão gênica do LTB4R1 diante da obesidade e RI induzidas pela DH, bem como os efeitos que o exercício físico foi capaz de promover nesse contexto. Até onde vai nosso conhecimento, esse foi o primeiro estudo a abordar os efeitos do exercício físico na resposta do LTB4, com o intuito de verificar a existência ou não da associação indireta entre o treinamento físico e a resposta imune adaptativa mediada por células no contexto da obesidade e RI. Recentemente, o LTB4 tem sido considerado como marcador inflamatório da obesidade, relacionado a quimiotaxia de células imunes nos tecidos em que há redução da sensibilidade à insulina<sup>74</sup>. Dado que houve atenuação da inflamação ligada a quimiotaxia de células imunes e melhora da RI presente na obesidade por meio de tratamento farmacológico e genético, postulamos que o exercício físico exercesse efeitos terapêuticos sobre a expressão do receptor primário do LTB4, LTB4R1. No ME, foi verificado, após aumento dos níveis de RNAm de LTB4R1 no grupo obeso alimentado com dieta rica em gordura (DH), redução não-significativa da expressão de LTB4R1 no grupo que treinou durante quatro semanas (DH+EC). Em suma, esse resultado foi o que mais se aproximou do esperado em relação ao efeito do exercício diante do eixo LTB4-LTB4R1.

Inicialmente, verificamos que doze semanas de dieta hiperlipídica levou ao aumento do peso corporal no grupo obeso sedentário (DH), que foi significativamente maior em relação ao grupo alimentado com dieta padrão para roedores (CTL). É importante frisar que apesar do impacto sobre o ganho de peso ser relativamente menor em comparação a outros tipos de dieta, há eficácia ligada a dieta hiperlipídica relacionada ao ganho de peso corporal de roedores<sup>75; 76</sup>. Além disso, já havia sido relatado que doze semanas de dieta hiperlipídica em camundongos *Swiss* promove ganho significativo de peso corporal associado a presença de RI, aumento da expressão de marcadores inflamatórios ligados ao fenótipo M1, assim como redução da resposta anti-inflamatória de genes ligados ao fenótipo M2<sup>77, 78</sup>.

Por outro lado, é comumente esperado que o exercício físico contribua com a redução do peso corporal, atenuação da inflamação e da RI, contribuindo também com a promoção de mecanismos anti-inflamatórios<sup>79</sup>. De fato, verificamos que o exercício físico resultou valores de média amostral relativamente menores em relação ao peso corporal. Entretanto, tal redução do peso corporal não ocorreu de forma significativa quando em comparação ao grupo DH, seja no grupo exercitado de forma aguda (DH+EA)

como naqueles exercitados cronicamente, após quatro semanas de exercício de natação (DH+EC). Apesar disso, nossos resultados estão de acordo com evidências sobre o efeito parcial do exercício físico frente a alimentação rica em gordura durante a fase de intervenção <sup>80</sup>. É bem estabelecido que reduções expressivas de peso corporal ocorrem da combinação entre exercício e alimentação com restrição calórica de nutrientes <sup>81; 82; 83</sup>.

Por outro lado, a redução do peso corporal pode ocorrer em estudos que utilizam o exercício físico crônico, uma vez que as adaptações a médio e longo prazo envolvem aumento de massa magra, aumento da taxa metabólica basal e diminuição expressiva do TAB, o que certamente caracteriza importante alteração de composição corporal <sup>84; 85; 86</sup>. Nesse sentido, apesar de não termos observado redução significativa do peso corporal do grupo DH+EC, não podemos descartar a possibilidade de que tenha ocorrido alteração na composição corporal desses animais, uma vez que não avaliamos tais parâmetros no presente estudo. Além disso, quatro semanas de treinamento aeróbio de intensidade moderada pode ter sido insuficiente para reduzir significativamente o peso corporal frente ao tempo total que os animais permaneceram inativos e em tratamento para ganho de peso. Corroborando com esse achado, Li e colegas<sup>87</sup>, demonstraram que mesmo oito semanas de treinamento físico podem não impactar significativamente o peso corporal de roedores obesos após obesidade instaurada pela DH.

Faz-se necessário ressaltar que era prevista a não redução do peso corporal dos animais exercitados uma única vez em comparação ao grupo DH sedentário. Estudos mostram que mesmo quando o exercício agudo está combinado a dietas com restrição calórica, uma única sessão de exercício aeróbio não leva a redução do peso corporal em função da diminuição dos níveis de gordura corporal <sup>69; 88</sup>. A obesidade, entendida como condição desenvolvida de forma crônica e multifatorial, definitivamente não é modulada por uma única sessão de exercício aeróbio de natação, mesmo de duração prolongada como o modelo aqui empregado. Um interessante trabalho já havia mostrado que mesmo comparando o efeito de diferentes intensidades, uma única sessão de exercício aeróbio não acarreta alterações significativas na composição corporal de camundongos obesos alimentados com DH <sup>89</sup>, descartando hipótese de que a ausência de sobrecarga ou a intensidade do protocolo agudo de esforço fosse insuficiente.

Apesar disso, mesmo quando o exercício não leva a perda considerável de peso corporal, espera-se a redução da meta-inflamação e melhora do quadro de RI <sup>40; 86</sup>. Diniz e colegas<sup>90</sup> mostraram que oito semanas de exercício aeróbio de moderada intensidade em esteira não afetou o grau de obesidade alcançado em oito semanas de DH. Contudo,

houve redução dos marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-6 no fígado, mediados pela ativação de PPAR- $\gamma$ . O exercício físico se mostra eficaz para controlar a inflamação por até doze semanas de DH, suprimindo a ativação da via NF- $\kappa$ B no ME de roedores exercitados em esteira rolante durante oito semanas, demonstrando sua eficácia em ser considerado como parte do tratamento da obesidade/RI induzida pela DH, mesmo sem afetar de maneira significativa o peso e a composição corporal dos animais <sup>87</sup>.

De fato, no presente estudo verificamos que doze semanas de DH foi eficaz para instalar o quadro sistêmico de intolerância à glicose e RI. Primeiramente, verifica-se que a glicemia de jejum de animais obesos foi significativamente superior aos animais do grupo controle. Corroborando, o GTT confirmou a intolerância à glicose, uma vez que os valores de área sob a curva (AUC) do grupo obeso foram significativamente maiores nos grupos alimentados com dieta rica em gordura (DH, DH+EA e DH+EC), assim como a velocidade de decaimento da glicose durante o teste de tolerância a insulina (kITT) no grupo DH foi significativamente menor. Segundo White & Brito<sup>91</sup>, o ganho de massa corpórea somado ao nível de resistência à ação da insulina alcançado, hiperglicemia de jejum e intolerância à glicose, leva a um modelo viável e reprodutível de obesidade induzida por dieta rica em gordura em camundongos *Swiss*, não somente atrelado ao efeito inflamatório provocado por esse tipo de dieta.

Diferentemente do que ocorre com a composição corporal, uma única sessão de exercício aeróbio pode melhorar a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose em roedores obesos <sup>92; 93</sup>. Assim, nossos resultados estão em acordo com a literatura, pois observamos que tanto o exercício agudo como quatro semanas de exercício aeróbio, cada um analisado isoladamente dentro de seu próprio *set* experimental, melhoraram a RI sistêmica de forma significativa em comparação ao grupo obeso sedentário. Em ambos os protocolos, houve melhora da tolerância à glicose, verificada pelo GTT. Em paralelo, o aumento do kITT dos grupos exercitados, revela melhora da tolerância à insulina em função da maior velocidade com que este hormônio passou a responder aos impactos da alimentação rica em gordura. Esses dados estão de acordo com o efeito do exercício agudo alcançado em pesquisas que utilizaram o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico, considerado como método padrão-ouro para identificar a resistência à ação da insulina e intolerância à glicose, pois identifica o aumento instantâneo da captação de glicose <sup>89</sup>. Este fenômeno pode ser explicado porque o exercício físico consegue estimular vias independentes da insulina para o aumento da captação de glicose, como a via da AMPK, o que explica a maior captação de glicose nos grupos exercitados. A AMPK é ativada em

situações de déficit energético e aumenta a translocação do GLUT-4 para a membrana da célula muscular a fim de manter a homeostase. Somado a isso, o exercício físico aumenta a captação de glicose em outros tecidos sensíveis a insulina, como o TA por exemplo <sup>89</sup>; <sup>94</sup>.

Ressalta-se que a glicemia de jejum foi o único indicador sistêmico da RI que o exercício não foi capaz de reduzir de forma significativa em comparação ao grupo obeso sedentário no presente trabalho. Apesar do exercício físico reduzir os valores de glicemia imediatamente após o término da sessão de treinamento <sup>95</sup>, tal fato não pôde ser evidenciado pelo grupo DH+EA no presente trabalho, que pode ser explicado pelo momento em que a coleta de glicemia foi realizada, entre 8 a 9 horas após o término da sessão de treinamento. De acordo, encontramos estudos que mostram que doze semanas de treinamento aeróbico em roedores com mutação no gene que induz à obesidade maciça, não levam a melhora dos níveis de glicemia de jejum, apesar da melhora dos demais parâmetros relacionados à RI <sup>96</sup>, semelhante aos resultados apresentados pelo presente trabalho.

Na etapa seguinte, avaliamos a repercussão na sinalização à insulina em todos os tecidos avaliados, a fim de verificar ação local do exercício físico em relação a sensibilidade à insulina. Conforme mencionado anteriormente, prejuízos nas etapas que constituem a via de sinalização da insulina impedem a devida translocação de GLUT-4 até a membrana celular, e a conseqüente entrada da glicose no interior das células <sup>97</sup>. Sendo assim, avaliamos a fosforilação de IR- $\beta$  e da AKT que, respectivamente, compõem a primeira a última etapa da via de sinalização da insulina antes da translocação do GLUT-4 no TAB e ME, e da inibição da neoglicogênese no fígado<sup>13</sup>. Cada grupo contou com uma amostra em que os tecidos foram estimulados pela insulina no momento da coleta e outra somente com salina, para fins controle e comparação experimental, o que permitiu somente analisar qualitativamente o grau de fosforilação IR- $\beta$  e da AKT. A marcação com  $\beta$ -actina foi utilizada como controle relativo entre as referidas etapas.

Na presença da RI, é esperada redução da fosforilação de IR- $\beta$  no grupo DH, que traduz a dificuldade que a insulina encontra em exercer sua função primária em seus tecidos-alvo diante da obesidade<sup>47</sup>, principalmente em relação às amostras não estimuladas com insulina. Porém, não encontramos diferença importante na fosforilação de IR- $\beta$  do animal DH em relação ao CTL no TAB e no fígado. Isso pode estar associado a despadronização da banda de controle ( $\beta$ -actina), que por sua vez impede uma análise assertiva sobre o grau de fosforilação entre os grupos do IR no TAB. No ME, percebe-se

esperada redução da fosforilação de IR- $\beta$  no grupo DH, indicativo de que existe prejuízo da via de sinalização de insulina no tecido muscular. Resultados semelhantes ocorreram diante da análise sobre o efeito da dieta ocidental em ratos diabéticos, que levou a redução da atividade do IR- $\beta$  no ME, mas não no TAB dos roedores<sup>98</sup>. Diversos autores entendem que tal fato se relaciona com a redução do transporte de glicose no ME, em consequência da DH<sup>13; 47</sup>. Por sua vez, não é possível afirmar que houve alteração da fosforilação da AKT nos tecidos avaliados, mesmo diante do exercício físico. Apesar da redução da fosforilação de AKT em serina nem sempre estar presente diante da obesidade induzida pela dieta rica em gordura<sup>99</sup>, não descartamos problemas com a correta técnica experimental. No fígado, uma sensível redução de p-AKT do grupo DH não estimulado com insulina em comparação ao grupo CTL indica menor eficácia da insulina em suprimir a PHG no fígado<sup>100</sup>. Apesar de não ser robusto, o exercício exerceu melhora na sinalização de insulina, com destaque para o aumento da fosforilação do IR- $\beta$  no ME no grupo DH+EC em comparação ao grupo DH, e para o aumento da fosforilação em serina da AKT no fígado e ME do grupo DH+EA.

Os resultados acima estão de acordo com Zhang e colegas<sup>101</sup>, que mostraram efeito semelhante do exercício físico no fígado de camundongos após dezesseis semanas de DH. Além disso, a fosforilação da AKT em serina no ME se mostrou superior após o treinamento de quatro semanas em comparação ao grau de fosforilação alcançado após uma única sessão de exercício aeróbio. Tal fato torna-se sugestivo que o ME pode desenvolver melhor tolerância à glicose à medida em que o exercício físico crônico permite melhor utilização e metabolização da glicose<sup>47</sup>. Novamente, isso pode ser explicado, pelo menos em parte, por meio da ativação de outras proteínas-quinase que regulam a disponibilidade de energia intracelular, pois a ativação da AMPK tem sido associada a um aumento da captação de glicose no tecido muscular<sup>50</sup>. Contudo, ressalta-se que boa parte dos resultados não estão de acordo com o esperado, o que pode estar relacionado a ineficácia do procedimento de infusão da insulina na etapa prévia à coleta dos tecidos.

Em meio a dificuldade encontrada para analisar de forma qualitativa as diferenças entre grupos alimentados com dieta rica em gordura na via de sinalização de insulina, futuras análises complementares podem ajudar a verificar se a translocação de GLUT-4 intracelular. É o que se pode esperar por meio da atividade da enzima citrato-sintase, marcador da atividade oxidativa muscular<sup>102</sup>, que poderia servir para atestar o efeito do exercício físico em comparação aos grupos não treinados. Apesar de não ter sido

analisada no presente projeto, evidências apontam que a citrato-sintase de ratos induzidos a obesidade por meio de DH possui relação indireta com o aumento da capacidade mitocondrial que o exercício aeróbio promove no ME<sup>103</sup>. O fato de o presente projeto ter utilizado o músculo gastrocnêmio para as referidas análises, ainda reflete um maior efeito em potencial desta enzima, em função da composição das fibras musculares existentes neste músculo. Por fim, o aumento da citrato-sintase está relacionado com a melhora da sensibilidade à insulina ligada a mecanismos em comum àqueles discutidos no presente trabalho, como maior ativação da AMPK e PPAR- $\gamma$ <sup>104</sup>.

Na principal metodologia descrita no presente trabalho, foi realizada avaliação quantitativa da expressão gênica de LTB4R1. Conforme descrito anteriormente<sup>59</sup>, ocorre aumento da expressão de LTB4R1 após pelo menos oito semanas de DH, suficientes para que a RI e o aumento da inflamação seguissem o ganho de peso corporal de roedores C57BL/6. Entretanto, a análise de RT-PCR em tempo real não apontou diferenças do nível de RNAm de LTB4R1 presente no TAB e no fígado após doze semanas de DH. Entre outros aspectos, essa discrepância com a literatura pode estar relacionada ao fato da análise de RNA muitas vezes não refletir o comportamento da quantidade de proteína traduzida em dado momento. Isto é, podemos não encontrar níveis aumentados de RNAm quando a expressão da proteína já atingiu os parâmetros suficientes para regular a necessidade fisiológica pretendida. Essa situação funciona para o devido controle da homeostase, pois sabe-se que existem processos de regulação interna do núcleo celular, que aumenta ou diminui constantemente a expressão de um gene. Conforme demonstrado, o ME foi o único tecido dentre os analisados em que foi possível analisar o padrão de expressão de LTB4R1 em acordo com o que foi previamente hipotetizado. Os níveis de RNAm foram significativamente maiores nos grupos DH e DH+EA em função da alimentação rica em gordura, assim como tais alterações sofreram influência do exercício físico, que modulou parcialmente a expressão de LTB4R1 no tecido muscular.

Inicialmente, considera-se que os grupos DH e DH+EA sofreram maior impacto de doze semanas de alimentação rica em gordura, uma vez que mantiveram comportamento sedentário durante todo experimento, potencializando o efeito da dieta rica em gordura<sup>95</sup>. Por sua vez, a redução significativa do RNAm de LTB4R1 no ME após quatro semanas de exercício aeróbio de moderada intensidade leva a crer que o exercício físico, pelo menos em parte, pode modular a expressão de LTB4, semelhante ao que já havia sido verificado através de inibição farmacológica do eixo LTB4-LTB4R1,

o que reduz a resposta do receptor acoplado a proteína G neste tecido, assim como ocorreu após a depleção gênica em modelo animal (LTB4R1KO) <sup>63</sup>.

Ressalta-se que a técnica de RT-PCR em tempo real no presente trabalho utilizou de baixo número de amostras analisadas por grupo, o que pode ter influenciado no fato da expressão de LTB4R1 no TAB e no fígado dos animais obesos não terem ocorrido conforme esperado, dado que o aumento da expressão de LTB4R1 nestes tecidos é amplamente reconhecida <sup>42; 60; 63; 66</sup>. Além disso, há de ser considerado que parte da literatura aponta que, mesmo diante do tratamento farmacológico voltado para reduzir a expressão de LTB4, o grau de obesidade e meta-inflamação alcançado em estudos com mais do oito semanas de dieta rica em gordura impede a redução significativa da expressão de LTB4R1 <sup>57; 74</sup>, fato que deve ter contribuído com o efeito parcial do exercício físico no ME após somente quatro semanas de treinamento.

Na última etapa do presente trabalho, comparamos a expressão dos demais marcadores inflamatórios com a resposta obtida de LTB4R1. Primeiro, procuramos examinar a expressão de RNAm das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL-2 e IL-4 no TAB, ME e fígado, a fim de associar a resposta destes marcadores pró- e anti-inflamatórios a expressão de RNAm de LTB4R1. Diante dos valores de RNAm obtidos de TNF- $\alpha$ , considerado pela literatura como principal marcador inflamatório local e sistêmico, houve aumento significativo da sua expressão no ME e TAB do grupo DH, seguido de redução não-significativa nos grupos exercitados. Tais resultados eram esperados em relação ao efeito em potencial de doze semanas de DH, conforme descrito anteriormente <sup>105</sup>, uma vez que a expressão de TNF- $\alpha$ , sobretudo no TAB, está associado a ação pró-inflamatória de MTAB, fenômeno demasiadamente associado a obesidade <sup>106</sup>. No ME, o aumento de RNAm de TNF- $\alpha$  está ligado a redução da sensibilidade à insulina e redução da fosforilação de AKT <sup>105</sup>. Dado que macrófagos possuem alta relação a obesidade induzida pela DH, comprovadamente associada a expressão de TNF- $\alpha$ , especula-se que o acúmulo destas células nos tecidos em que houve aumento de TNF- $\alpha$  esteja relacionado com a apresentação de antígenos relacionados ao recrutamento de células B no TAB, fato que deveria ter sido ligado ao aumento do RNAm de LTB4R1.

Por sua vez, para verificar se o exercício físico resultou em efeito anti-inflamatório tecidual, analisamos o gene de IL-4, mediante a possibilidade de sua expressão ser modulada positivamente por meio do exercício <sup>107</sup>. No TAB, o fato da expressão de IL-4 ser significativamente menor em comparação ao grupo CTL está de acordo com Monteiro e colaboradores <sup>108</sup>, que verificaram que a redução dos níveis de IL-4 no TAB está

associada ao desenvolvimento da obesidade, hiperglicemia, RI, dislipidemias, lesão hepática e inflamação dos adipócitos. Sendo que esta última ainda se relaciona com a diminuição da fosforilação de AKT no TAB e no fígado, ambas também analisadas no presente trabalho. Contudo, não houve redução significativa do RNAm de IL-4 no fígado.

No próprio ME, contudo, apesar dos valores de média para expressão gênica do grupo controle serem inferiores ao grupo DH, o exercício físico agudo mostrou aumento significativo dos valores de RNAm de IL-4, superior ao verificado no grupo exercitado cronicamente, explicado pelo imediato efeito anti-inflamatório promovido pela contração muscular, relacionado a melhora da RI e restauração do equilíbrio entre a razão M1/M2. No fígado, a expressão de IL-4 nos grupos exercitados foi maior do que o grupo CTL, indicativo de que tal marcador anti-inflamatório seja responsivo ao exercício, pois apesar das alterações não serem estatisticamente relevantes, percebe-se uma tendência de melhora dos valores de média de RNAm. A IL-4 já havia sido relatada como um marcador do exercício físico que contribui para a sensibilidade à insulina, fornecendo um potencial alvo terapêutico de RI e doenças metabólicas relacionadas <sup>109</sup>.

Tomados em conjunto os resultados discutidos até aqui indicam a necessidade de mais estudos para melhor delinear o efeito do exercício físico sobre o LTB4R1. Mais especificamente, futuros estudos devem manipular diferentes intensidades e volumes de treinamento. Pode-se considerar ainda a alteração do tipo de exercício proposto, uma vez que o exercício em esteira pode modular a resposta inflamatória de maneira diferente do ocorrido por meio do exercício de natação. Dada característica qualitativa do exercício de natação, pode-se ainda estipular que seus efeitos sejam diferentes da proposta que o treinamento de força possa promover, pautado pelo maior impacto sobre a estrutura musculoesquelética, somado ao seu alto grau de eficácia em modelos que preconizam o emagrecimento e o tratamento da RI <sup>110</sup>.

Por fim, há de se ressaltar que os estudos prévios que analisaram a expressão do LTB4R1 utilizaram em sua metodologia linhagem animal diferente do proposto pelo presente projeto. De fato, a linhagem *Swiss* se mostra compatível para modular os efeitos da RI, obesidade e inflamação induzidas pela DH, assim como ocorre em relação ao efeito do exercício físico. Por isso, a utilização da espécie *mus musculus* se mostra eficaz para reproduzir mecanismos fisiológicos em comum com seres humanos. Entretanto, não encontramos evidências prévias que verificaram o papel do exercício físico no eixo LTB4-LTB4R1 na espécie *Swiss* até a conclusão do presente trabalho. Dessa forma, deve-

se considerar reproduzir o delineamento aqui proposto, porém utilizando-se de modelo animal C57/BL na tentativa de melhor reproduzir o papel do eixo LTB4-LTB4R1.

Finalmente, futuros delineamentos talvez se beneficiem da combinação entre a análise do RNAm via PCR em tempo real e técnicas semiquantitativas que avaliem o padrão de uma proteína de interesse traduzida, como no caso do *immunoblotting* (que no presente projeto foi utilizado somente para análise da via de sinalização da insulina) ou espectrometria de massas. A análise isolada de somente uma das ciências ômicas não reflete de forma fiel a verdadeira razão entre a transcrição-tradução de proteínas, uma vez que nem sempre a taxa de transcrição revela de fato uma proteína traduzida, graças a mecanismos de controle interno da célula. Entretanto, a análise em conjunto das técnicas citadas torna mais robusta a análise da relação entre a ativação e a expressão do LTB4R1 e a consequente liberação de fato de LTB4 em função da alimentação rica em gordura e sua modulação por meio do exercício físico.

## 7. CONCLUSÕES

Diante do exposto até aqui, podemos concluir que:

- Quatro semanas de exercício físico aeróbio de moderada intensidade não foram suficientes para reduzir significativamente o peso corporal dos animais induzidos a obesidade após doze semanas de DH.
- Tanto uma única sessão de exercício físico aeróbio quanto aquele realizado durante quatro semanas de forma crônica reduziram significativamente a intolerância à glicose e melhoraram a sensibilidade à insulina.
- Houve melhora da fosforilação de IR e AKT somente no ME.
- Após doze semanas de DH, foi verificada expressão significativamente maior de LTB4R1 no músculo-esquelético.
- Após doze semanas de DH, não foi verificada expressão significativamente maior de LTB4R1 no tecido adiposo e no fígado.
- Uma sessão de exercício aeróbio não levou a alterações da expressão gênica de LTB4R1 no músculo-esquelético, fígado e tecido adiposo.
- Quatro semanas de exercício aeróbio crônico não foram suficientes para reduzir os níveis de LTB4R1 no músculo-esquelético, fígado e tecido adiposo em comparação ao grupo obeso sedentário. No músculo-esquelético, o exercício crônico reduziu os níveis de LTB4R1 somente em comparação ao grupo obeso exercitado de forma aguda.
- Houve redução dos níveis inflamatórios de TNF- $\alpha$  no músculo-esquelético e no tecido adiposo, seguido de melhora parcial e não significativa da expressão gênica nos grupos exercitados, tanto de forma aguda como crônica.
- Houve aumento da expressão de IL-4 no músculo-esquelético, fígado e tecido adiposo. Entretanto, tal melhora não foi significativa, indicando apenas um efeito anti-inflamatório em potencial.

Tomados em conjunto, os dados apresentados revelam que o exercício físico aeróbio de intensidade moderada, seja por meio de uma única sessão como de forma crônica, possui um potente efeito sobre os níveis de resistência à insulina, capaz de melhorar a intolerância à glicose e a sensibilidade à insulina de maneira sistêmica e a nível tecidual, além de melhorar a fosforilação em serina de AKT e IR. Entretanto, quatro semanas de treinamento físico não foram suficientes para reduzir significativamente o

peso corporal. Foi possível verificar a modulação da expressão gênica do LTB4R1 somente no músculo-esquelético, tecido que evidenciou tanto o aumento dos níveis de RNAm em função da obesidade induzida pela DH como melhora local da expressão gênica através do exercício físico, mesmo que de forma não significativa. Além disso, de maneira não significativa, o mesmo tecido mostrou um potencial efeito anti-inflamatório em virtude da redução parcial dos níveis de TNF- $\alpha$  e aumento dos níveis de IL-4.

## 8. REFERÊNCIAS

- 1 ELAGIZI, A. et al. An Overview and Update on Obesity and the Obesity Paradox in Cardiovascular Diseases. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 61, n. 2, p. 142-150, 2018 Jul - Aug 2018. ISSN 1873-1740. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29981771> >.
- 2 ASSOCIATION, W. H. [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/). . 2019.
- 3 BERNAL, R. T. I. et al. Surveillance System for Risk and Protective Factors for Chronic Diseases by Telephone Survey (Vigitel): changes in weighting methodology. **Epidemiol Serv Saude**, v. 26, n. 4, p. 701-712, 2017 Oct-Dec 2017. ISSN 2237-9622. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29211136> >.
- 4 MALTA, D. C. et al. Mortality due to noncommunicable diseases in Brazil, 1990 to 2015, according to estimates from the Global Burden of Disease study. **Sao Paulo Med J**, v. 135, n. 3, p. 213-221, 2017 May-Jun 2017. ISSN 1806-9460. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28746656> >.
- 5 HERBST, A. et al. Impact of regular physical activity on blood glucose control and cardiovascular risk factors in adolescents with type 2 diabetes mellitus--a multicenter study of 578 patients from 225 centres. **Pediatr Diabetes**, v. 16, n. 3, p. 204-10, May 2015. ISSN 1399-5448. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24888254> >.
- 6 CREE-GREEN, M. et al. Youth with Type 2 Diabetes Have Hepatic, Peripheral and Adipose Insulin Resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Dec 2018. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30562061> >.
- 7 ARROYO-JOHNSON, C.; MINCEY, K. D. Obesity epidemiology trends by race/ethnicity, gender, and education: National Health Interview Survey, 1997–2012. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 45, n. 4, p. 571-579, 2016.
- 8 EVANS, J. et al. Oral and Injectable (Non-Insulin) Pharmacological Agents for Type 2 Diabetes. In: (Ed.), 2016. p.1-37.
- 9 YE, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Front Med**, v. 7, n. 1, p. 14-24, Mar 2013. ISSN 2095-0225. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471659> >.
- 10 ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 105, n. 2, p. 141-50, Aug 2014. ISSN 1872-8227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798950> >.

- 11 TITOS, E. et al. Signaling and Immunoresolving Actions of Resolvin D1 in Inflamed Human Visceral Adipose Tissue. **J Immunol**, v. 197, n. 8, p. 3360-3370, 10 2016. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27647830> >.
- 12 FLORES, M. B. et al. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2554-61, 09 2006. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16936204> >.
- 13 PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. **Physiol Rev**, v. 98, n. 4, p. 2133-2223, Oct 2018. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30067154> >.
- 14 TOBAR, N. et al. Diacerein improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice on a high-fat diet. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4080-93, Nov 2011. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896669> >.
- 15 ZAFAR, U. et al. Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. **Hormones (Athens)**, Aug 2018. ISSN 2520-8721. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30171523> >.
- 16 JOHNSON, A. M.; OLEFSKY, J. M. The origins and drivers of insulin resistance. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 673-84, Feb 2013. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415219> >.
- 17 MALIN, S. K. et al. A whole-grain diet reduces peripheral insulin resistance and improves glucose kinetics in obese adults: A randomized-controlled trial. **Metabolism**, v. 82, p. 111-117, 05 2018. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29305946> >.
- 18 SARGSYAN, A.; HERMAN, M. A. Regulation of Glucose Production in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. **Curr Diab Rep**, v. 19, n. 9, p. 77, 08 2019. ISSN 1539-0829. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31377934> >.
- 19 GU, S. et al. Comparison of Glucose-Lowering Drugs as Second-Line Treatment for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Clin Med**, v. 11, n. 18, Sep 16 2022. ISSN 2077-0383. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36143082> >.
- 20 UUSITUPA, M. et al. Prevention of Type 2 Diabetes by Lifestyle Changes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 11, n. 11, Nov 01 2019. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31683759> >.
- 21 AUTORES, V. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. 2017. 383

- 22 KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-6, Dec 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167471> >.
- 23 LAUTERBACH, M. A.; WUNDERLICH, F. T. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Pflugers Arch**, v. 469, n. 3-4, p. 385-396, 04 2017. ISSN 1432-2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28233125> >.
- 24 HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177-185, 02 2017. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179656> >.
- 25 XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1821-30, Dec 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679177> >.
- 26 APOSTOLOPOULOS, V. et al. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. **Mol Nutr Food Res**, v. 60, n. 1, p. 43-57, Jan 2016. ISSN 1613-4133. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26331761> >.
- 27 CALLE, M. C.; FERNANDEZ, M. L. Effects of resistance training on the inflammatory response. **Nutr Res Pract**, v. 4, n. 4, p. 259-69, Aug 2010. ISSN 2005-6168. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20827340> >.
- 28 BRADLEY, R. L. et al. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 3, p. E586-94, Sep 2008. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18577694> >.
- 29 ALVAREZ, M. M. et al. Delivery strategies to control inflammatory response: Modulating M1-M2 polarization in tissue engineering applications. **J Control Release**, v. 240, p. 349-363, 10 2016. ISSN 1873-4995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778695> >.
- 30 KRÜGER, K. et al. Immune and Inflammatory Signaling Pathways in Exercise and Obesity. **Am J Lifestyle Med**, v. 10, n. 4, p. 268-279, 2016 Jul-Aug 2016. ISSN 1559-8276. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30202282> >.
- 31 JOHNSON, A. M. F.; HOU, S.; LI, P. Inflammation and insulin resistance: New targets encourage new thinking: Galectin-3 and LTB. **Bioessays**, v. 39, n. 9, 09 2017. ISSN 1521-1878. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28752547> >.

- 32 LANCASTER, G. I.; FEBBRAIO, M. A. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease. **Trends Immunol**, v. 35, n. 6, p. 262-9, Jun 2014. ISSN 1471-4981. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24680647> >.
- 33 IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat Immunol**, v. 16, n. 4, p. 343-53, Apr 2015. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789684> >.
- 34 WOODS, J. A.; VIEIRA, V. J.; KEYLOCK, K. T. Exercise, inflammation, and innate immunity. **Neurol Clin**, v. 24, n. 3, p. 585-99, Aug 2006. ISSN 0733-8619. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16877125> >.
- 35 DAM, V.; SIKDER, T.; SANTOSA, S. From neutrophils to macrophages: differences in regional adipose tissue depots. **Obes Rev**, v. 17, n. 1, p. 1-17, Jan 2016. ISSN 1467-789X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667065> >.
- 36 SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, Sep 2018. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29319160> >.
- 37 HARIZI, H.; GUALDE, N. Dendritic cells produce eicosanoids, which modulate generation and functions of antigen-presenting cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 66, n. 5-6, p. 459-66, 2002 May-Jun 2002. ISSN 0952-3278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12144865> >.
- 38 YING, W. et al. miR-150 regulates obesity-associated insulin resistance by controlling B cell functions. **Sci Rep**, v. 6, p. 20176, Feb 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26833392> >.
- 39 LI, C. et al. Macrophage polarization and meta-inflammation. **Transl Res**, v. 191, p. 29-44, 01 2018. ISSN 1878-1810. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29154757> >.
- 40 GOH, J.; GOH, K. P.; ABBASI, A. Exercise and Adipose Tissue Macrophages: New Frontiers in Obesity Research? **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 7, p. 65, 2016. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27379017> >.
- 41 DEFURIA, J. et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 13, p. 5133-8, Mar 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479618> >.
- 42 YING, W. et al. Adipose tissue B2 cells promote insulin resistance through leukotriene LTB4/LTB4R1 signaling. **J Clin Invest**, v. 127, n. 3, p. 1019-1030, Mar 2017. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28192375> >.

- 43 FEBBRAIO, M. A. Exercise metabolism in 2016: Health benefits of exercise - more than meets the eye! **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 2, p. 72-74, 02 2017. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28051119> >.
- 44 ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **J Physiol**, v. 577, n. Pt 3, p. 997-1007, Dec 2006. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008371> >.
- 45 SWIFT, D. L. et al. The Effects of Exercise and Physical Activity on Weight Loss and Maintenance. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 61, n. 2, p. 206-213, 2018 Jul - Aug 2018. ISSN 1873-1740. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30003901> >.
- 46 OLIVEIRA, A. G. et al. Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 12, p. 2545-56, Dec 2013. ISSN 1930-739X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23512570> >.
- 47 BURESH, R. Exercise and glucose control. **J Sports Med Phys Fitness**, v. 54, n. 4, p. 373-82, Aug 2014. ISSN 0022-4707. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25034542> >.
- 48 FLORES-OPAZO, M.; MCGEE, S. L.; HARGREAVES, M. Exercise and GLUT4. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 48, n. 3, p. 110-118, 07 2020. ISSN 1538-3008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32568924> >.
- 49 KRISTIANSEN, S. et al. Glucose uptake is increased in trained vs. untrained muscle during heavy exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 89, n. 3, p. 1151-8, Sep 2000. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956363> >.
- 50 FRIEDRICHSEN, M. et al. Exercise-induced AMPK activity in skeletal muscle: role in glucose uptake and insulin sensitivity. **Mol Cell Endocrinol**, v. 366, n. 2, p. 204-14, Feb 2013. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796442> >.
- 51 ROPELLE, E. R. et al. Statement of Retraction. A Central Role for Neuronal AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in High-Protein Diet-Induced Weight Loss. **Diabetes** 2008;57:594-605. DOI: 10.2337/db07-0573. **Diabetes**, v. 66, n. 3, p. 786-787, 03 2017. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188143> >.
- 52 HOFFMAN, N. J. et al. Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. **Cell Metab**, v. 22, n. 5, p. 922-35, Nov 03 2015. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437602> >.

- 53 PEDERSEN, B. K. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. **Eur J Clin Invest**, v. 47, n. 8, p. 600-611, Aug 2017. ISSN 1365-2362. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722106> >.
- 54 CRONIN, O. et al. The effect of exercise interventions on inflammatory biomarkers in healthy, physically inactive subjects: a systematic review. **QJM**, v. 110, n. 10, p. 629-637, Oct 2017. ISSN 1460-2393. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472518> >.
- 55 STANFORD, K. I.; MIDDELBEEK, R. J.; GOODYEAR, L. J. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2361-8, Jul 2015. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26050668> >.
- 56 GLASS, C. K.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell Metab**, v. 15, n. 5, p. 635-45, May 02 2012. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22560216> >.
- 57 CHAKRABARTI, S. K. et al. Evidence for activation of inflammatory lipoxygenase pathways in visceral adipose tissue of obese Zucker rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, n. 1, p. E175-87, Jan 2011. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20978234> >.
- 58 ALBERCA-CUSTÓDIO, R. W. et al. Aerobic Exercise Reduces Asthma Phenotype by Modulation of the Leukotriene Pathway. **Front Immunol**, v. 7, p. 237, 2016. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27379098> >.
- 59 SPITE, M. et al. Deficiency of the leukotriene B4 receptor, BLT-1, protects against systemic insulin resistance in diet-induced obesity. **J Immunol**, v. 187, n. 4, p. 1942-9, Aug 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21742977> >.
- 60 LE BEL, M.; BRUNET, A.; GOSSELIN, J. Leukotriene B4, an endogenous stimulator of the innate immune response against pathogens. **J Innate Immun**, v. 6, n. 2, p. 159-68, 2014. ISSN 1662-8128. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23988515> >.
- 61 SONNWEBER, T. et al. Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 11, Oct 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30360467> >.
- 62 ELIAS, I. et al. ALOX5AP Overexpression in Adipose Tissue Leads to LXA4 Production and Protection Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 65, n. 8, p. 2139-50, 08 2016. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27207555> >.
- 63 LI, P. et al. LTB4 promotes insulin resistance in obese mice by acting on macrophages, hepatocytes and myocytes. **Nat Med**, v. 21, n. 3, p. 239-247, Mar

2015. ISSN 1546-170X. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25706874>>.
- 64 HIRATA, K. et al. Critical role of leukotriene B4 receptor signaling in mouse 3T3-L1 preadipocyte differentiation. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 122, Aug 2013. ISSN 1476-511X. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23937951>>.
- 65 RAMALHO, T. et al. Leukotriene-B4 modulates macrophage metabolism and fat loss in type 1 diabetic mice. **J Leukoc Biol**, v. 106, n. 3, p. 665-675, 09 2019. ISSN 1938-3673. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31242337>>.
- 66 CALLEGARI, I. O. M.; OLIVEIRA, A. G. The Role of LTB4 in Obesity-Induced Insulin Resistance Development: An Overview. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 13, p. 848006, 2022. ISSN 1664-2392. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35392132>>.
- 67 OHKUBO, H. et al. Leukotriene B4 type-1 receptor signaling promotes liver repair after hepatic ischemia/reperfusion injury through the enhancement of macrophage recruitment. **FASEB J**, v. 27, n. 8, p. 3132-43, Aug 2013. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23629862> >.
- 68 DE LEMOS, E. T. et al. Regular physical exercise as a strategy to improve antioxidant and anti-inflammatory status: benefits in type 2 diabetes mellitus. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 741545, 2012. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22928086> >.
- 69 DE SOUZA, C. T. et al. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 12, p. 2239-53, 06 2010. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421289> >.
- 70 LIU, W. et al. Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins. **J Affect Disord**, v. 227, p. 126-135, 02 2018. ISSN 1573-2517. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29055260> >.
- 71 SCHUETZE, S. et al. Aged mice show an increased mortality after anesthesia with a standard dose of ketamine/xylazine. **Lab Anim Res**, v. 35, p. 8, 2019. ISSN 1738-6055. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32257896>>.
- 72 PATI, P. et al. Liver circadian clock disruption alters perivascular adipose tissue gene expression and aortic function in mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 320, n. 6, p. R960-R971, 06 01 2021. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33881363> >.

- 73 ST-AMAND, R. et al. Two weeks of western diet disrupts liver molecular markers of cholesterol metabolism in rats. **Lipids Health Dis**, v. 19, n. 1, p. 192, Aug 21 2020. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32825820> >.
- 74 ESMAILI, S.; GEORGE, J. Ltb4r1 inhibitor: A pivotal insulin sensitizer? **Trends Endocrinol Metab**, v. 26, n. 5, p. 221-2, May 2015. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25858788> >.
- 75 SANDOUK, Z.; LANSANG, M. C. Diabetes with obesity--Is there an ideal diet? **Cleve Clin J Med**, v. 84, n. 7 Suppl 1, p. S4-S14, Jul 2017. ISSN 1939-2869. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28708478> >.
- 76 REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.
- 77 SILVA, G. et al. Insulin resistance is improved in high-fat fed mice by photobiomodulation therapy at 630 nm. **J Biophotonics**, v. 13, n. 3, p. e201960140, 03 2020. ISSN 1864-0648. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31707768> >.
- 78 NAKAMITSU, P. Z. et al. Thalidomide controls adipose tissue inflammation associated with high-fat diet-induced obesity in mice. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 15, n. 2, p. 151-8, 2015. ISSN 2212-3873. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25441253> >.
- 79 YOU, T. et al. Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity : current evidence and potential mechanisms. **Sports Med**, v. 43, n. 4, p. 243-56, Apr 2013. ISSN 1179-2035. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23494259> >.
- 80 VIEIRA, V. J. et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 5, p. E1164-71, May 2009. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19276393> >.
- 81 LUO, W. et al. Eccentric exercise and dietary restriction inhibits M1 macrophage polarization activated by high-fat diet-induced obesity. **Life Sci**, v. 243, p. 117246, Feb 2020. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31904367> >.
- 82 AHN, N.; KIM, K. Combined influence of dietary restriction and treadmill running on MCP-1 and the expression of oxidative stress-related mRNA in the adipose tissue in obese mice. **J Exerc Nutrition Biochem**, v. 18, n. 3, p. 311-8, Sep 2014. ISSN 2233-6834. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25566468> >.

- 83 DAVIS, R. A. H. et al. High-intensity interval training and calorie restriction promote remodeling of glucose and lipid metabolism in diet-induced obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 313, n. 2, p. E243-E256, 08 01 2017. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28588097> >.
- 84 XIONG, Y. et al. Moderate-Intensity Continuous Training Improves FGF21 and KLB Expression in Obese Mice. **Biochemistry (Mosc)**, v. 85, n. 8, p. 938-946, Aug 2020. ISSN 1608-3040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33045954> >.
- 85 XUAN, W. et al. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. **J Leukoc Biol**, v. 97, n. 1, p. 61-9, Jan 2015. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359998> >.
- 86 AUTENRIETH, C. et al. Association between different domains of physical activity and markers of inflammation. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 9, p. 1706-13, Sep 2009. ISSN 1530-0315. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19657301> >.
- 87 LI, N. et al. Aerobic Exercise Prevents Chronic Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle of High-Fat Diet Mice. **Nutrients**, v. 14, n. 18, Sep 10 2022. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36145106> >.
- 88 BALTACI, A. K. et al. The effect of acute swimming exercise on plasma leptin in rats. **Bratisl Lek Listy**, v. 113, n. 10, p. 592-4, 2012. ISSN 0006-9248. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23094896> >.
- 89 MARINHO, R. et al. Effects of different intensities of physical exercise on insulin sensitivity and protein kinase B/Akt activity in skeletal muscle of obese mice. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 12, n. 1, p. 82-9, 2014 Jan-Mar 2014. ISSN 2317-6385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24728251> >.
- 90 DINIZ, T. A. et al. Aerobic training improves NAFLD markers and insulin resistance through AMPK-PPAR- $\alpha$  signaling in obese mice. **Life Sci**, v. 266, p. 118868, Feb 01 2021. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33310034> >.
- 91 WHITE, P. A. et al. [Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 57, n. 5, p. 339-45, Jul 2013. ISSN 1677-9487. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23896799> >.
- 92 KARSTOFT, K.; PEDERSEN, B. K. Exercise and type 2 diabetes: focus on metabolism and inflammation. **Immunol Cell Biol**, v. 94, n. 2, p. 146-50, Feb 2016. ISSN 1440-1711. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26568029> >.

- 93 MUL, J. D. et al. Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 135, p. 17-37, 2015. ISSN 1878-0814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26477909> >.
- 94 MCCONELL, G. K. et al. Acute exercise increases insulin sensitivity in adult sheep: a new preclinical model. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 308, n. 6, p. R500-6, Mar 15 2015. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25568078> >.
- 95 TEIXEIRA DE LEMOS, E. et al. Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus. **Mediators Inflamm**, v. 2011, p. 253061, 2011. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174491> >.
- 96 CUNHA, V. N. et al. Role of exercise intensity on GLUT4 content, aerobic fitness and fasting plasma glucose in type 2 diabetic mice. **Cell Biochem Funct**, v. 33, n. 7, p. 435-42, Oct 2015. ISSN 1099-0844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26467261> >.
- 97 APPARI, M.; CHANNON, K. M.; MCNEILL, E. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes. **Antioxid Redox Signal**, v. 29, n. 3, p. 297-312, 07 2018. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28661198> >.
- 98 PRADA, P. O. et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1 ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1576-87, Mar 2005. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591151> >.
- 99 CHAKRABORTY, C. Biochemical and molecular basis of insulin resistance. **Curr Protein Pept Sci**, v. 7, n. 2, p. 113-21, Apr 2006. ISSN 1389-2037. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611137> >.
- 100 SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **J Clin Invest**, v. 126, n. 1, p. 12-22, Jan 2016. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26727229> >.
- 101 ZHANG, Y. et al. Exercise ameliorates insulin resistance and improves ASK1-mediated insulin signalling in obese rats. **J Cell Mol Med**, v. 25, n. 23, p. 10930-10938, 12 2021. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34734480> >.
- 102 ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, v. 154, n. 3, p. 689-700, Mar 15 1976. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8036> >.

- 103 CORTEZ, M. Y. et al. Insulin resistance of obese Zucker rats exercise trained at two different intensities. **Am J Physiol**, v. 261, n. 5 Pt 1, p. E613-9, Nov 1991. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1951686> >.
- 104 GENDERS, A. J. et al. Exercise does not improve insulin resistance and mitochondrial characteristics together. **J Endocrinol**, v. 252, n. 2, p. 91-105, 12 09 2021. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34783678> >.
- 105 HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 01 1993. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678183> >.
- 106 WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, Dec 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679176> >.
- 107 ABDALLA, D. R.; MURTA, E. F.; MICHELIN, M. A. The influence of physical activity on the profile of immune response cells and cytokine synthesis in mice with experimental breast tumors induced by 7,12-dimethylbenzanthracene. **Eur J Cancer Prev**, v. 22, n. 3, p. 251-8, May 2013. ISSN 1473-5709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22976388> >.
- 108 MONTEIRO, P. A. et al. Immunometabolic Changes in Hepatocytes Arising from Obesity and the Practice of Physical Exercise. **Curr Pharm Des**, v. 24, n. 27, p. 3200-3209, 2018. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29766791> >.
- 109 CHEN, Z. et al. Upregulation of IL-4 signaling contributes to aerobic exercise-induced insulin sensitivity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 525, n. 3, p. 662-667, 05 07 2020. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32127173> >.
- 110 GUEDES, J. M. et al. Muscular resistance, hypertrophy and strength training equally reduce adiposity, inflammation and insulin resistance in mice with diet-induced obesity. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 18, p. eAO4784, 2020. ISSN 2317-6385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31553356> >.

9. ANEXOS

Anexo I – Folha de aprovação da comissão de Ética do Uso de Animal CEUA



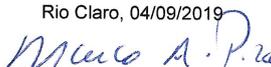
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAL  
CEUA – IB – UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 22/2019

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 23.04/2019	
<b>CERTIFICADO</b>	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeitos do exercício físico no LTB4 em animais com resistência à insulina.", protocolo nº 2845, sob responsabilidade de Irineu Otávio Marchiori Callegari ( Pesquisador Responsável), e Alexandre Gabarra de Oliveira (orientador) que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto n 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal ( CONCEA).	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==.==	
<b>Colaboradores:</b> Andrey dos Santos	
A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 41ª reunião ordinária, realizada em 04.09.2019.	
(x)	Aprovou as alterações referentes a espécie de animais, do Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
( )	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
( )	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
( )	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
( )	Não Aprovou.
( )	Retirou, devido à permanência das pendências.
Vigência da autorização: 01/06/19 a 31/05/21	
Finalidade: ( ) Ensino (x) Pesquisa Científica	
Espécie/linhagem/raça: camundongos Swiss- <i>Mus musculus</i>	
Número de animais: 120 Peso: 20 g Idade: 6 semanas Sexo: Macho	
Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): CPPA – Centro de Pesquisa e Produção de Animais-Botucatu.	
Objetivo Acadêmico:	( ) TCC (x) Mestrado ( ) Doutorado ( ) Outros – (Iniciação Científica) ( ) Pós- Graduação

Rio Claro, 04/09/2019

  
Prof. Dr. Marco Aurélio Pizo Ferreira  
Coordenador