

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

LOREANA SANCHES SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNO-METABÓLICA EM
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS
OBESOS: PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO PPAR- γ**

Presidente Prudente

2018

LOREANA SANCHES SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNO-METABÓLICA EM
MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS
OBESOS: PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO E DO PPAR- γ**

Tese apresentada a Faculdade de
Ciência e Tecnologia do Campus de
Presidente Prudente da Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências da Motricidade.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Santos de
Lira.

Presidente Prudente
2018

S587a Silveira, Loreana Sanches
Avaliação da resposta imuno-metabólica em macrófagos peritoneais de camundongos obesos: : papel do exercício físico e do PPAR-gamma / Loreana Sanches Silveira. -- Presidente Prudente, 2018
147 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente
Orientador: Fábio Santos de Lira

1. Macrófagos. 2. Obesidade. 3. Exercício Físico. 4. Transcrição gênica. 5. Resposta Imune. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

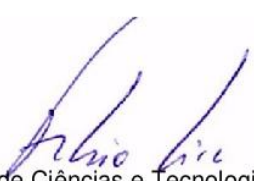
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

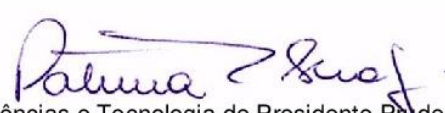
TÍTULO DA TESE: Avaliação da resposta imunometabólica em macrófagos peritoneais de camundongos obesos: papel do exercício físico e do PPAR γ

AUTORA: LOREANA SANCHES SILVEIRA

ORIENTADOR: FABIO SANTOS DE LIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE , especialidade: Biodinamica da Motricidade Humana pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FABIO SANTOS DE LIRA 
Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM 
Departamento de Fisioterapia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

Prof. Dr. ROMULO ARAÚJO FERNANDES 
Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. WILLIAM TADEU LARA FESTUCCIA 
Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo

Profa. Dra. PATRÍCIA CHIMIN PERANDINI 
Departamento de Fundamentos da Educação Física / Universidade Estadual de Londrina

Presidente Prudente, 11 de dezembro de 2018

*Dedico a presente tese aos meus pais,
minha irmã e a todos os estudantes de
pós-graduação.*

*À minha família pelo apoio e aos
estudantes pela admiração.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a todos aqueles que colaboraram efetivamente para que um dia eu chegasse até aqui.

Aos meus pais por todo o privilégio, nasci em uma família que me deu todo o suporte. À minha irmã por ter sempre apoiado minha decisão de ser professora de educação física. A todos os professores que de alguma forma me inspiraram ou ajudaram. Ao Prof. Fábio Lira que me concedeu esta oportunidade de doutorado e em especial, ao Prof. Zeca o qual sem o apoio e amizade o dia de hoje não seria possível. Aos meus colegas de laboratório que me acolheram e fizeram dessa caminhada muito mais leve e agradável (Lu, Helenão, Camila, Dri, Xandy, Edinho, Tiego, Jeff, Carol e Fran). A todos os professores que abriram as portas dos seus laboratórios pra mim, em especial ao Prof. Willian T. Festuccia, que colaborou imensamente com esse trabalho. A cada camundongo que foi eutanasiado para que esta pesquisa pudesse ser concluída. Às agências de fomento CAPES e FAPESP por todo o apoio financeiro, aos Programas de Ciências da Motricidade e ao Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Agradecer também aos que complementaram minha experiência. Aos Prof. Philip Calder e Prof. Rohan Lewis da Universidade de Southampton onde eu tive o prazer de passar um ano de muito aprendizado e crescimento profissional. Aos amigos que partilhei tão bons momentos e que levarei pela minha vida com muito carinho (Vivian, Stefania, Isabell, Ella, Claudia, Chris, Helena, Annette, Mariela, Jenny, Emma, Brogan, Helen e Carina).

Aos amigos que foram presentes durante esses quase cinco anos, o por todas as trocas de experiências. Kelly e Mariel pelas inúmeras conversas produtivas no corredor de casa, e ao Vitor por sido meu parceiro com todo o fiel significado que esta palavra pode carregar. Minha mais pura gratidão a vocês.

O mérito dessa conquista definitivamente NÃO é exclusivamente meu, eu carrego a colaboração de cada um de vocês na minha jornada, e dizer que esse mérito é MEU estaria tornando natural o fato de muitos infelizmente não terem as mesmas oportunidades que eu tive para ir tão longe.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Período 03/2014 a 05/2015.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas e auxílio financeiro de tamanha importância para o desenvolvimento deste trabalho e produção científica com o auxílio financeiro por meio da Bolsa de Doutorado no País Processo 2014/01246-6 (período de 01/06/2015 a 31/12/2018); e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) Processo 2017/08530-0 (período de 17/07/2017 a 13/07/2018).

"É o ego que dá-lhe feridas e te machuca. É o ego que faz você violento, com raiva, com ciúmes, competitivo. É o ego que é continuamente o sentido miserável da vida".

(Osho)

RESUMO

Silveira, L. S. **Avaliação da resposta imuno-metabólica em macrófagos peritoneais de camundongos obesos: papel do exercício físico e do PPAR- γ .** 2018.147 f. Tese (Doutorado em Ciências da Motricidade) – Universidade do Estado de São Paulo UNESP. Presidente Prudente, 2018

O treinamento físico aeróbio é considerado uma terapia para doenças inflamatórias crônicas de baixo grau devido sua resposta anti-inflamatória mediada por células do sistema imunológico. O receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama (PPAR- γ) é capaz de regular a polarização M1 (caráter pró-inflamatório) e M2 (caráter anti-inflamatório), assim como a resposta imunometabólica dos macrófagos. Desta maneira, propusermos na presente tese verificar se a deleção condicional do PPAR- γ em macrófagos teria algum efeito sobre o papel anti-inflamatório do exercício aeróbio moderado. Para testar nossa hipótese, foram utilizadas duas linhagens de animais: PPAR- γ $LyzCre^{+/+}$ (KO) e animais controle da mesma ninhada (WT). Cada genótipo foi dividido em 1) dieta controle sedentário; 2) dieta controle e treinamento moderado; 3) dieta hiperlipídica sedentário (HF) e 4) dieta hiperlipídica e treinamento moderado (HFT). O protocolo experimental teve duração de doze semanas, sendo quatro semanas apenas de dieta e oito semanas de dieta e exercício. Foram avaliados o perfil metabólico dos animais e o perfil inflamatório de macrófagos peritoneais e do tecido adiposo subcutâneo (TAS). A deleção do PPAR- γ não afetou a composição corporal ou o desempenho no teste físico em animais alimentados com dieta controle, no entanto o treinamento não apenas proporcionou melhoras metabólicas mas também na resposta imune de animais nocaute. A indução da obesidade promoveu hipertrofia no TAS de animais KO, no entanto o perfil inflamatório não foi exacerbado. Macrófagos peritoneais de animais KO exibiram acentuado ambiente inflamatório após estímulo com LPS. A adoção do programa de treinamento físico aeróbio moderado protegeu ambos os genótipos do ganho de peso, reduziu a ingestão calórica e a hipertrofia do TAS de animais KO. O treinamento físico modulou a produção de citocinas em macrófagos peritoneais, embora a polarização M2 tenha exibido atenuação na ausência de PPAR- γ . Tomados em conjunto, nossos achados demonstram importante papel modulador do fator de transcrição PPAR- γ em marcadores M2 de macrófagos, porém sua deleção não impediu os efeitos anti-inflamatórios mediados pelo exercício físico.

Palavras-chave: exercício físico moderado; sistema imunológico; metabolismo; citocinas; fatores transcricionais.

ABSTRACT

SILVEIRA, L. S. **Evaluation of immuno-metabolic response in peritoneal macrophages of obese mice: role of physical exercise and PPAR- γ .** 2018.147 f. PhD thesis (Movement Science) - São Paulo State University UNESP. Presidente Prudente, 2018

Aerobic physical training is considered a therapy for chronic low-grade inflammatory diseases due to its anti-inflammatory response mediated by immune cells. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) is able to regulate the M1 (pro-inflammatory) and M2 (anti-inflammatory) polarization, as well as the immunometabolic response of macrophages. Thus, we propose in the present thesis to verify whether the conditional deletion of PPAR- γ in macrophages would have any effect on the anti-inflammatory role of moderate aerobic exercise. To test our hypothesis, two animal strains were used: PPAR- γ LyzCre^{+/+} (KO) and littermates control animals (WT). Each genotype was divided into 1) sedentary control diet; 2) control diet and moderate training (T); 3) sedentary high fat diet (HF) and 4) high fat diet and moderate training (HFT). The experimental protocol lasted for 12 weeks, four weeks of diet only and eight weeks of diet and exercise. The metabolic profile of the animals and the inflammatory profile of peritoneal macrophages and subcutaneous adipose tissue (SAT) were evaluated. The PPAR- γ deletion did not affect body composition or physical test performance in control diet fed animals, however the training not only provided metabolic but also the immune response enhancements on knockout animals. The induction of obesity promoted hypertrophy in the SAT, though the inflammatory profile was not exacerbated in KO animals. Peritoneal macrophages of KO animals exhibited a marked inflammatory environment after LPS stimulation. The moderate aerobic training program protected both genotypes from weight gain, reduced caloric intake and hypertrophy of SAT from KO animals. Training modulated cytokine production in peritoneal macrophages, although M2 polarization exhibited attenuation in the absence of PPAR- γ . In summary, our findings demonstrate an important modulatory role of the transcription factor PPAR- γ in macrophages M2 markers, but its deletion did not prevent the exercise-mediated anti-inflammatory effect.

Key words: moderate physical exercise; immune system; metabolism; cytokines; transcriptional factors.

Lista de abreviaturas e siglas

AAM macrófagos ativados alternativamente - *alternatively activated macrophages*
ABCA1 transportador A1 de cassete de ligação de ATP - *ATP-binding cassette transporter A1*
AGL ácidos graxos livres
Akt proteína quinase B
ASC proteína semelhante à partícula associada a apoptose - *Apoptosis-associated Speck-like Protein*
CAM macrófagos ativados classicamente - *classically activated macrophages* -
CCL22 ligante quimiocina de forma C-C 22
CD cluster de diferenciação
COL Colesterol
CXCL10 quimiocina em forma de C-X-C 10
GLI glicose
GLUT-4 transportador de glicose 4 - *glucose transporter type 4*
HDL lipoproteína de alta densidade – *high density lipoprotein*
HF hiperlipídica - *high fat*
HIF1 α fator indutor de hipóxia 1alfa - *hypoxia induction factor – 1 alpha*
IFN- γ interferon gama
IKK I κ B quinase
IL-10 interleucina 10
IL-13 interleucina 13
IL-1ra receptor antagonista de interleucina 1
IL-1 β interleucina 1 beta
IL-4 interleucina 4
IL-6 interleucina 6
IMC índice de massa corporal
iNOS óxido nítrico sintase induzível - *inducible Nitric oxide synthase*
interferon-gama (IFN- γ)
IRAK quinase associada ao receptor de interleucina 1 - *Interleukin-1 receptor-associated kinase* -
IRF fator de regulação do IFN - *interferon-regulatory factor*
IRS-1 receptor de insulina tipo 1 - *insulin receptor type 1*
KO nocaute - *knockout*
LBP proteína de ligação de lipopolissacarídeos - *lipid binding protein*
LPS lipopolissacarídeos
LXR α receptor de fígado X alfa - *Liver X receptor alpha (LXR-alpha)*
M1 macrófagos do tipo 1
M2 macrófagos do tipo 2
MAPK Proteína-quinase ativada por mitógenos - *Mitogen Activated Protein Kinases*
MCP-1 Proteína quimioatraente de macrófagos 1 - *Monocyte chemoattractant protein-1*
MMP matrix de metaloproteinase;
MSK proteína quinase ativada por estresse - *mitogen stress activated protein kinase*

MyD88 gene de resposta primária de diferenciação mieloide 88 - *Myeloid differentiation primary response 88*

NEFA ácido graxos não esterificados - *Non-esterified fatty acids*

NFκB fator nuclear kappa B - *nuclear factor kappa B*

NLR receptor do tipo NOD - *nod-like receptor*

NLRP3 receptor do tipo NOD P3 - *nod-like receptor P3*

OMS Organização Mundial da Saúde

PCR reação em cadeia da polimerase - *polymerase chain reaction*

PKA proteína quinase A

PPAR receptor ativado por proliferador peroxissomal - *peroxisome proliferator activated receptor*

PPRE elemento de resposta de proliferação peroxissomal - *peroxisome proliferator response element*

RAR receptor trans ácido retinóico

RI resistência à insulina – *insulin resistance*

ROS espécies reativas de oxigênio - *reactive oxygen species*

RXR receptor 9-cis ácido retinóico

SFB soro fetal bovino

STAT transdutor de sinal e o ativador da transcrição

T2D diabetes tipo 2 - *type 2 diabetes*

TA tecido adiposo

TAG triacilglicerol

TAS tecido adiposo subcutâneo

Th1 linfócitos T helper 1

Th2 linfócitos T helper 2

TLR4 receptor tipo Toll-4 - *toll like receptor 4*

TNFR-6 fator associado a TRAF6 - *TNFR-associated Factor 6*

TNFα fator de necrose tumoral alfa - *tumor necrosis factor*

TRAF fator associado ao receptor de TNF - *TNF receptor-associated factor* -

TRIF adaptador contendo o domínio TIR que induz interferon-β - *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*

TZD thiazolidinedionas

WT tipo selvagem - *wild type*

Lista de Figuras

Figura 1. Desequilíbrio das células do sistema imunológico no tecido adiposo na obesidade..	20
Figura 2. Características dos deferentes tipos de remodelamento do tecido adiposo. ..	22
Figura 3. Características de macrófagos M1 e M2.....	25
Figura 4. Ativação da via inflamatória, mediada por LPS.	27
Figura 5. Mecanismo de ação do PPAR.....	30
Figura 6. Modelo experimental genético do sistema CreLox	35
Figura 7. Delineamento do estudo.....	38
Figura 8. Características genótípicas de camundongos nocaute condicional para PPAR- γ em células mielóides.....	45
Figura 9. Efeito da deleção do PPAR- γ e treinamento sobre o a velocidade máxima atingida no teste máximo em esterira.	46
Figura10. Variáveis de composição corporal dos camundongos WT e KO sedentários e treinados.	46
Figura11. Efeito de deleção de PPAR- γ e do treinamento na ingestão calórica, homeostase glicêmica e resistência à insulina.....	47
Figura12. Efeito de supressão de PPAR- γ sobre variáveis séricas de camundongos sedentários e treinados.....	48
Figura 13. Efeitos do exercício moderado em marcadores de polarização de macrófagos em camundongos com deleção de PPAR- γ em células mielóides (KO) e controles (WT).	49
Figura14. Produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos WT e KO sedentários e submetidos ao treinamento, estimulados ou não por LPS (2,5 μ g/mL).	50
Figura 15. Conteúdo de citocinas no tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO sedentários e submetidos ao treinamento.	51
Figura 16. Expressão de genes envolvidos em vias inflamatórias em macrófagos peritoneais estimulados ou não por LPS.	52
Figura 17. Variáveis de composição corporal dos camundongos WT e KO submetidos a dieta hiperlipídica.	60
Figura 18. Efeito de deleção de PPAR- γ e da dieta hiperlipídica na ingestão calórica, eficiência energética e leptina no soro.....	61
Figura 19. Efeito de deleção de PPAR- γ e da dieta hiperlipídica na homeostase glicêmica e resistência à insulina..	62
Figura 20. Efeito de supressão de PPAR- γ sobre variáveis séricas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.....	63
Figura 21. Imagens representativas dos cortes histológicos dos tecidos adiposos subcutâneo, epididimal e retroperitoneal te animais WT e KO controle e alimentados com dieta hiperlipídica.	64
Figura 22. Morfologia dos tecidos adiposos de animais WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica..	65
Figura 23. Conteúdo de citocinas do adipócito isolado do tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO submetidos a dieta hiperlipídica.	66

Figura 24. Conteúdo de citocinas no tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica..	67
Figura 25. Produção de citocinas por cultura de macrófagos peritoneais de camundongos WT e KO control e submetidos a dieta hiperlipídica, estimulados ou não por LPS (2,5µg/mL)...	68
Figura 26. Teste máximo e marcadores de desempenho em animais WT e KO obesos submetidos ao treinamento aeróbio..	73
Figura 27. Efeito de deleção de PPAR-γ e do treinamento aeróbio em obesos sobre variáveis do consumo alimentar..	74
Figura 28. Variáveis de composição corporal dos camundongos WT e KO obesos submetidos ao treinamento aeróbio.....	75
Figura 29. Metabolismo de glicose de animais WT e KO submetidos a dieta hiperlipídica e exercício aeróbio.....	76
Figura 30. Efeito de deleção do PPAR-γ e exercício aeróbio sobre o perfil lipídico e adiponectina no soro de camundongos obesos.	77
Figura 31. Imagens representativas dos cortes histológicos dos tecidos adiposos subcutâneo, epididimal e retroperitoneal corados com eosina e hematoxilina e aumento de 40x.	78
Figura 32. Morfologia dos tecidos adiposos de animais WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento aeróbio..	79
Figura 33. Caracterização fenotípica de macrófagos por citometria de fluxo. Efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício moderado sobre marcadores de polarização de macrófagos infiltrados no tecido adiposo subcutâneo em camundongos com deleção de PPAR-γ (KO) e controles (WT)..	80
Figura 34. Conteúdo de citocinas do adipócito isolado do tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO obesos submetidos ao treinamento aeróbio.	81
Figura 35. Conteúdo de citocinas no tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO obesos submetidos ao treinamento aeróbio.	82
Figura 36. Caracterização fenotípica de macrófagos por citometria de fluxo. Efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício moderado sobre marcadores de polarização de macrófagos peritoneais em camundongos com deleção de PPAR-γ (KO) e controles (WT).	83
Figura 37. Produção de citocinas de macrófagos peritoneais de camundongos obesos WT e KO submetidos ao treinamento aeróbio estimulados ou não por LPS (2,5µg/mL).	84
Figura 38. Expressão de genes envolvidos em vias inflamatórias em macrófagos peritoneais estimulados ou não por LPS..	85

Lista de Quadros

Quadro 1. Informação nutricional das dietas (Porção de 100g).....	37
Quadro 2. Composição da dieta hiperlipídica	37
Quadro 3. Anticorpos utilizados para análise de moléculas de superfície de macrófagos	43
Quadro 4. Primers utilizados para expressão gênica em macrófagos peritoneais.....	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Obesidade e sistema imunológico.....	19
2.2 Macrófagos peritoneais.....	22
2.3 Inflamação crônica de baixo grau	26
2.4 Exercício físico e PPAR- γ	28
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. HIPÓTESE.....	33
5. MATERIAS E MÉTODOS.....	34
5.1 Animais.....	34
5.2 Genotipagem	35
5.3 Dieta.....	36
5.4 Protocolo de treinamento	37
5.5 Testes de tolerância à glicose e insulina	38
5.6 Eutanásia e coleta de amostras.....	39
5.7 Análises Plasmáticas.....	40
5.8 Extração de ácidos graxos do fígado	40
5.10 Cultura de macrófagos	40
5.11Cortes histológicos.....	41
5.12 Purificação de células infiltradas no tecido adiposo e avaliação de fenótipos celulares por citometria de fluxo.....	42
5.13 Isolamento de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real	43
5.14 Análise dos resultados	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1 CAPÍTULO 1.....	46
6.1.1 Composição corporal e desempenho não se alteram com a deleção do PPAR- γ em células mieloides	52
6.1.2 Treinamento melhora parâmetros metabólicos	53
6.1.3 Treino restaura resposta imune na ausência de PPAR- γ em células mieloides	53
6.1.4 DISCUSSÃO.....	54
6.2 CAPÍTULO 2.....	60

6.2.1 PPAR- γ parece interferir no remodelamento de tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica.....	69
6.2.2 Ausência de PPAR- γ no macrófago infiltrado no tecido adiposo subcutâneo apresenta diferentes respostas inflamatórias induzida pela dieta hiperlipídica.....	69
6.2.3 Ausência de PPAR- γ no macrófago intraperitoneal exacerba resposta inflamatória induzida pelo LPS.....	70
6.2.4 DISCUSSÃO.....	71
6.3 CAPÍTULO 3.....	73
6.3.1 Treino físico aeróbio evita ganho de peso exacerbado em ambos genótipos e reduz ingestão calórica apenas em animais KO	86
6.3.2 Treinamento reduz glicemia e insulina em jejum em animais WT alimentados com dieta hiperlipídica	86
6.3.3 Treino evita hipertrofia no tecido adiposo subcutâneo de animais KO	87
6.3.4 Exercício sustenta efeitos anti-inflamatórios em macrófagos peritoneais que apresentaram polarização M2 prejudicada pela ausência de PPAR- γ	88
6.3.5 DISCUSSÃO.....	89
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
8. REFERENCIAS	98
9. ANEXOS.....	109
9.1. Comitê de Ética no Uso de Animais	109
9.2. Artigo Publicado na Cell Biochemistry and Function	111
9. 3. Revisão publicada na Eukaryotic Gene Expression	119
9.4. Artigo original publicado na Journal of Cell Physiology	137

1. INTRODUÇÃO

O sedentarismo é considerado importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas de baixo grau, como o diabetes *mellitus* do tipo 2, obesidade, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e alguns tipos de câncer [Pedersen, 2009 #1]. Esse fator de risco está associado ao aumento da adiposidade, principalmente visceral, apontada como elo com o desenvolvimento dessas doenças. Desde a década de 90, já incitavam a presença de citocinas pró-inflamatórias, como o caso do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em células do tecido adiposo, e sua participação no processo de resistência à insulina, causado pela deficiência na sua sinalização, especialmente no receptor IRS-1, e no seu transportador GLUT-4 (HOTAMISLIGIL ET AL., 1994).

Em resposta a este estímulo inflamatório, o sistema imunológico inato, com função de combate a agentes estressores (bactéria, vírus, etc.), também pode promover respostas a estes estímulos endógenos, geradas por uma combinação de sinais inflamatórios sistêmicos ou por respostas específicas do tecido ao excesso de nutrientes (LUMENG, 2013; LEE & LEE, 2014). Os macrófagos, células imunocompetentes que fazem parte do sistema inato de defesa, possuem uma subpopulação localizada no tecido adiposo, mesmo em situações de ausência da inflamação. No entanto, como consequência de sinais inflamatórios e metabólicos, ocorre aumento no número de macrófagos infiltrados no tecido adiposo (GORDON & TAYLOR, 2005). Em estado de quebra da homeostase causada por um ambiente inflamatório, por exemplo, podem ocorrer alterações fenotípicas desses macrófagos, que deixam de apresentar características anti-inflamatórias como as apresentadas no tecido adiposo de sujeitos eutróficos, tornando-se pró-inflamatórios (LUMENG ET AL., 2007a; RIGAMONTI ET AL., 2008; LEE & LEE, 2014).

A capacidade de mudança no fenótipo de macrófagos do tipo 1 (clássico) para o tipo 2 (alternativo) está relacionada à atividade da família de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ) (ODEGAARD ET AL., 2007), acreditando-se também ser um dos responsáveis pela resistência à insulina sistêmica em obesos via proteína quimioatraente de monócitos do tipo 1 (MCP-1) (KAMEI ET AL., 2006). No que diz respeito a alterações metabólicas, sabe-se que a polarização de macrófagos M1 está relacionada ao aumento no metabolismo glicolítico devido à necessidade de consumo energético imediato (BISWAS & MANTOVANI, 2012), e diminuição da oxidação de ácidos graxos (ODEGAARD & CHAWLA, 2011).

Em 2010, Kawanishi e colaboradores demonstraram que animais obesos treinados exibiram capacidade de alterar o fenótipo de macrófagos do tecido adiposo de M1 para M2 (KAWANISHI ET AL., 2010). Os efeitos benéficos do treinamento aeróbio moderado (~65-70% VO₂max) sobre a prevenção ou tratamento da inflamação crônica de baixo grau, são promissores (PETERSEN & PEDERSEN, 2005, Lira, 2010 #15; LIRA ET AL., 2012), no entanto, os mecanismos moleculares pelo quais o treinamento físico aeróbio moderado é capaz de induzir redução da resposta inflamatória crônica são incipientes.

Há indícios que mostram o papel fundamental do PPAR- γ como importante regulador dessa resposta anti-inflamatória, nos macrófagos, assim como a relevância desse tipo celular na manutenção do grau de inflamação em doenças metabólicas como a obesidade e o diabetes tipo 2 (T2D).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Obesidade e sistema imunológico*

A obesidade é caracterizada por uma desordem metabólica em consequência ao excesso nos estoques de tecido adiposo branco. Este excesso por sua vez pode ser determinado pela interação de fatores genéticos, ambientais e psicossociais que podem levar ao desequilíbrio entre o gasto e ingestão de energia (KOPELMAN, 2000). No ano de 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que cerca de 13% da população adulta mundial apresentava índice de massa corporal (IMC) acima de 30kg/m², e que 39% exibiam quadro de sobrepeso (WHO, 2015). No ano de 2017, as capitais brasileiras apresentaram prevalência de excesso de peso em adultos variando entre 46,8 e 59,8% e obesidade entre 15 e 23,8%, segundo dados da Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL, 2017).

A partir do momento que se notou aumento na prevalência da obesidade concomitante ao de doenças metabólicas, passou-se a buscar respostas para a ligação entre elas, e os primeiros estudos nesse sentido já mostravam o envolvimento do tecido adiposo, desempenhando papel fundamental na produção de moléculas envolvidas na resposta inflamatória de baixo grau (HOTAMISLIGIL ET AL., 1993; SPIEGELMAN & HOTAMISLIGIL, 1993). O tecido adiposo é constituído na sua predominância por adipócitos, e exibe restrita área de estroma vascular. O estroma vascular é constituído por fibroblastos, pré- adipócitos, macrófagos, entre outras células.

Com a descoberta do papel endócrino ao tecido adiposo, especialmente após desvendar o gene da leptina em 1994 (ZHANG ET AL., 1994), foi destacada a sua interação com diferentes sistemas fisiológicos, incluindo o sistema imunológico, porém o mecanismo que inicia a resposta inflamatória originada da obesidade ainda não foi totalmente elucidado, sendo que a natureza dessa inflamação induzida pelo ganho de

peso, especialmente em alguns depósitos específicos do tecido adiposo branco, não pode ser comparada a outras respostas inflamatórias, tais como doenças autoimunes ou infecções (LUMENG & SALTIEL, 2011).

O tecido adiposo pode sofrer remodelamento de maneira dinâmica que ocorre a partir de mudanças no número (hiperplasia) e/ou tamanho (hipertrofia) dos adipócitos. No caso da obesidade, este remodelamento é acompanhado de células que compõe a porção estromal na tentativa de manter a homeostase do tecido (CHOE ET AL., 2016). Desta forma, células especializadas do sistema imunológico passam a ser recrutadas em maior quantidade ao tecido adiposo (Figura 1). Estudos têm mostrado que grande parte dessas células são macrófagos, independentemente da localização do tecido adiposo, e que são as responsáveis por quase toda a expressão de $\text{TNF-}\alpha$ e por quantidades significativas de iNOS e IL-6 (WEISBERG ET AL., 2003).

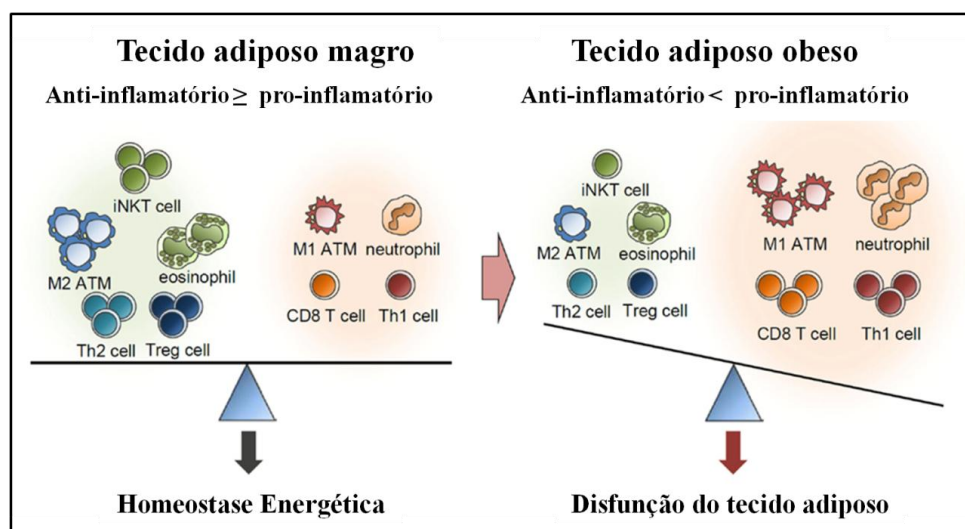


Figura 1. Desequilíbrio das células do sistema imunológico no tecido adiposo na obesidade. Há uma quantidade maior de células de perfil pró-inflamatório no tecido adiposo obeso. Adaptado de Choe (2016) (CHOE ET AL., 2016). iNKT= natural killer inatas; M1 ATM= macrófago tipo 1; M2 ATM= macrófago tipo 2; Th1= linfócitos T helper 1; Th2= linfócitos T helper 2; T reg= linfócitos T regulatórios.

Neste contexto, existem algumas hipóteses que podem explicar o maior recrutamento celular para este tecido, uma delas se dá pelo início da maior liberação de ácidos graxos livres oriundos destes adipócitos necróticos e consequentemente também

leva ao maior recrutamento dessas células com o intuito de fagocitar (KOSTELI ET AL., 2010). Outra hipótese se trata da hipertrofia dos adipócitos e redução no aporte de oxigênio ofertado ao tecido, fenômeno também conhecido como hipóxia causado pela redução do fluxo sanguíneo, tanto em regiões de tecido adiposo subcutâneo como visceral em sujeitos obesos, favorecendo a via de morte celular alternativa, a qual exhibe características morfológicas de necrose e consequente aumento da presença de macrófagos (CINTI ET AL., 2005).

O microambiente de hipóxia vai além da desordem na secreção de adipocinas e regulação positiva de alguns fatores transcricionais, como o HIF-1 (Hypoxic Inducible Factor-1) (TRAYHURN ET AL., 2008), mas também direciona para resposta fibrótica e pró-inflamatória (SUN ET AL., 2011), estimulando a quimiotaxia de macrófagos por meio de secreção de proteínas como a proteína quimioatraente de monócitos do tipo 1 (MCP-1) (SARTIPY & LOSKUTOFF, 2003). (Figura 2)

Como consequência a este acúmulo de tecido adiposo e sua consequente resposta inflamatória, cria-se um estado de inflamação crônica de baixo grau, ou seja, é predominante a produção/secreção de citocinas pró-inflamatórias.

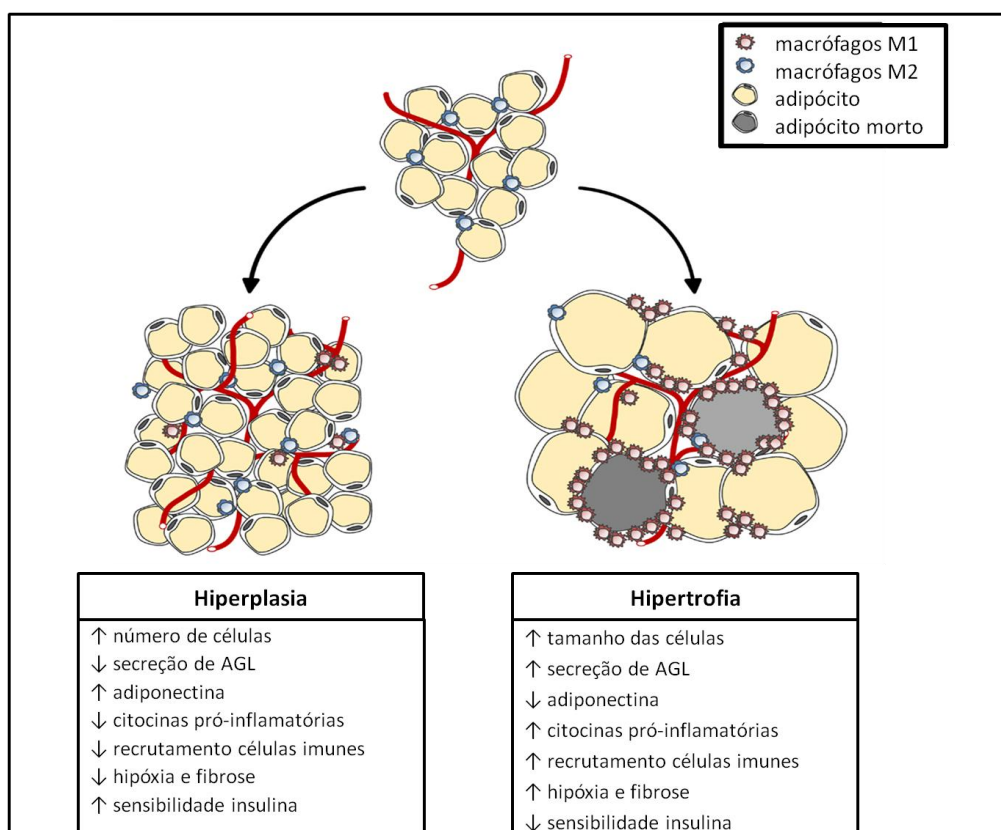


Figura 2. Características dos diferentes tipos de remodelamento do tecido adiposo. Adaptado de Choe (2016) (CHOE ET AL., 2016). AGL = ácidos graxos livres

2.2 Macrófagos peritoneais

Os macrófagos foram inicialmente identificados pelo pesquisador russo Élie Metchnikoff, como células capazes de fagocitar, ou seja, digerir células que fossem consideradas indesejáveis, sendo então consideradas como uma forma de barreira inicial de proteção ao organismo (HIRSCH, 1959). Essas células podem ter origem embrionária ou da medula óssea, dependendo do tecido e do estímulo ao qual serão submetidas (ITALIANI & BORASCHI, 2015).

Um dos atributos desse fagócito é a sua presença em grande parte dos tecidos, sendo esses denominados macrófagos residentes, justificando o fato de constituir parte de determinado tecido. Podem ser citados como exemplos de macrófagos aqueles presentes no fígado (Células de Kupffer), nos alvéolos pulmonares, no sistema nervoso central (microglia), cavidade peritoneal (macrófagos peritoneais) entre outros

(DOUGLAS & MUSSON, 1986; GUILLEMIN & BREW, 2004). Células da microglia, por exemplo, tem sua origem no saco vitelino, já os macrófagos presentes na microbiota intestinal são derivados de monócitos originados da medula óssea (ITALIANI & BORASCHI, 2015).

Outra importante particularidade dos macrófagos é a sua capacidade funcional diversificada, sendo esta influenciada por diferentes fatores, entre eles o tempo de vida da célula, sendo sua capacidade fagocítica e de produção de citocinas pró-inflamatórias alteradas de acordo com seu tempo de vida (CECILIO ET AL., 2011). Também exercem grande influência na diversidade e no estado de ativação dos macrófagos os produtos tumorais, antígenos e os produtos de células T auxiliares (Th1 e Th2) (MUNDER ET AL., 1998), dando origem à classificação para este estado de ativação no qual se encontra o macrófago classicamente ativado (M1) ou ativados alternativamente (M2).

Apesar da presença de macrófagos em grande parte dos tecidos e órgãos, a escolha de trabalhar com macrófagos da cavidade peritoneal é justificada por ser um modelo que tem sido amplamente utilizado em estudos biológicos nesta área (COHN, 1962; TURCHYN ET AL., 2007). A cavidade peritoneal está localizada na região abdominal, na qual se localizam diversos órgãos e o fluido peritoneal, um líquido claro composto essencialmente de ultrafiltrado de plasma e leucócitos residentes, sendo a composição de macrófagos de aproximadamente 70% (KOLACZKOWSKA ET AL., 2010). Esta cavidade é revestida por uma membrana muito permeável chamada peritônio, com grande capacidade de absorção, admitindo a passagem das substâncias da circulação sanguínea para o espaço peritoneal, assim como o oposto, permitindo a influência de substâncias presentes na circulação sanguínea no líquido peritoneal (RIPPE, 1993). Pode-se ainda ressaltar a sua proximidade com o tecido adiposo visceral, e que além dos fatores lipogênicos que podem ocasionar o acúmulo de gordura na região intra-

abdominal, aumento nos estoques de gordura nesta área estão fortemente relacionados ao aumento na inflamação (YUDKIN, 2007).

Ainda, o acúmulo de gordura visceral pode estar relacionado às características da resistência á insulina (RI), devido ao aumento de receptores adrenérgicos $\beta 3$, que estimulam a lipólise neste tecido, fazendo com que a sua atividade lipolítica seja aumentada e liberando, portanto, ácidos graxos livres com elevado potencial hepatotóxico. Além disso, é no tecido adiposo visceral que são produzidas algumas citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (AYONRINDE ET AL., 2011).

Macrófagos são células dinâmicas e sua capacidade funcional pode ser influenciada pelo microambiente em que se encontram. Essa plasticidade celular pode se depender, por exemplo, de produtos de células T (Th1 ou Th2), que resultam em macrófagos M2 envolvidos na remodelação tecidual e função imunomoduladora, ou em macrófagos M1 os quais possuem propriedades anti-tumorícas e anti-bacterícas (MARTINEZ & GORDON, 2014).

É importante enfatizar que macrófagos necessitam de um estímulo para que haja sua alteração de fenótipo, e que dependendo da sua polarização essas células exibem um metabolismo energético distinto. Em M1 é predominante o metabolismo glicolítico, por ser um modo mais rápido de produção de energia devido à sua importância como sendo a primeira linha de defesa do sistema imunológico (imunidade inata). Neste caso a atividade da cadeia respiratória é atenuada, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e também a iNOS que se origina do catabolismo de arginina. Em contraste, os macrófagos M2 são mais oxidativos e estão associados à imunização contra parasitas e cicatrização de tecidos, exercendo assim funções em longo prazo comparado aos M1. Neste caso a produção de arginase-1 é essencial para a produção de

ureia, poliaminas e ornitina, que são indispensáveis para a cicatrização tecidual (BISWAS & MANTOVANI, 2012; GALVAN-PENA & O'NEILL, 2014).

Dentre as moléculas que podem agir na polarização M1 dos macrófagos estão o interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) e os lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina presente na membrana externa de bactérias gram-negativas. Por outro lado, interleucina-4 (IL-4) e -13 (IL-13) estão associadas a macrófagos M2 (BISWAS & MANTOVANI, 2012) (Figura 3).

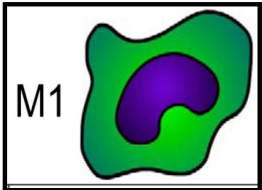
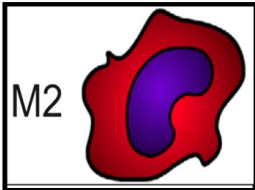
		
Estímulo de polarização	$\text{IFN-}\gamma$, LPS, $\text{IFN-}\gamma$ +LPS	IL-4, IL-13, IL-10, glicocorticóides
Fenótipo	Pro-inflamatório	Anti-inflamatório
Morfologia <i>in vitro</i>	Circular/oval	Alongado, semelhante a fibroblastos
Produtos/Marcadores	$\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, CXCL10, pSTAT1, MMP9	IL-10, TGF- β , CCL17, CCL22, CD163, CD206, pSTAT3/6
Atividade fagocítica	Alta	Baixa
Apresentação Antígeno	Alta	Baixa
Metabolismo de arginina	iNOS; Arginina $\rightarrow$ NO	Arg-1: Arginina $\rightarrow$ ornitina
Capacidade antibactericida	Alta	Baixa
Efeitos no tumor	Tumoricida	Pro-tumorigênico

Figura 3. Características de macrófagos M1 e M2. Adaptado de Isidro (2016). (ISIDRO & APPLEYARD, 2016). $\text{IFN}\gamma$ = interferon gamma; LPS = lipopolissacarídeos; IL = interleucina; $\text{TNF-}\alpha$ = fator de necrose tumoral alfa; CXCL10 = quimiocina em forma de C-X-C 10; STAT = transdutor de sinal e o ativador da transcrição; CD=cluster de diferenciação; iNOS = óxido nítrico sintase induzida; MMP = matrix de metaloproteinase; CCL22 = ligante Quimiocina de forma C-C 22.

2.3 Inflamação crônica de baixo grau

O excesso de lipídeos circulantes, principalmente ácidos graxos saturados de cadeia longa, provenientes do excesso de ácidos graxos na dieta e consequente aumento da lipólise em estado basal, agem como ligantes intracelulares capazes de ativar vias de sinalização relacionadas à resposta inflamatória (LEE ET AL., 2001). Além da hipóxia, outro fator modulado pela obesidade é o aumento de LPS circulante, que se dá pela facilidade estrutural dessa molécula em atravessar a mucosa intestinal e este processo parece ser regulado pela microbiota intestinal (CANI ET AL., 2008). O exercício físico também pode comprometer a permeabilidade da parede da mucosa intestinal, por meio de redistribuição do fornecimento de sangue para a periferia (VAN WIJCK ET AL., 2012), assim como alguns estudos mostram que essa permeabilidade pode levar a uma tolerância à endotoxemia gerada pela exposição crônica o LPS (BOSENBERG ET AL., 1988).

Atualmente, é sabido que em decorrência da obesidade uma resposta do sistema imunitário inato pode ser iniciada por meio de ácidos graxos causando ativação de receptores de reconhecimento padrão e dando início a vias inflamatórias tais como I κ B quinase / fator nuclear kappa B (IKK/NF- κ B), e a via do inflamassoma que envolve o receptor do tipo NOD P3 (NLRP3) (RINGSEIS ET AL., 2015). Tanto o ácido graxo livre, como o LPS (ligado ao *LPS binding protein*-[LBP]), agem sobre receptores da família *Toll Like Receptor*, em particular o TLR-4, ativando a via de sinalização do NF- κ B, favorecendo a expressão gênica das citocinas pro inflamatórias (LEE ET AL., 2001; TAKEUCHI & AKIRA, 2001). Huang et al (2013) (HUANG ET AL., 2013) demonstraram que ácidos graxos saturados induzem aumento na expressão proteica de TLR-2 e TLR-4 em monócitos, ocasionando aumento na produção de TNF- α . A cascata de ativação do TLR-4 constitui um fenômeno altamente complexo e variado, mediado por meio de reações envolvendo fosforilação e ubiquitinação de proteínas alvo, levando a ativação

da proteína (*myeloid differentiation primary response gene 88*) MyD88, que por sua vez ativa o complexo IRAK (Receptor da IL-1 associada à Kinase)-TRAF 6 (Fator associado ao receptor do TNF 6), esta última pertence à classe das ubiquitina ligases (E3 ligases) associado ao desacoplamento do NF- κ B da sua proteína inibidora (Ik-B). Assim, o NF- κ B, uma vez liberado, migra para o núcleo ligando-se ao DNA, iniciando a amplificação gênica das proteínas relacionadas à inflamação (TAKEDA & AKIRA, 2004) (Figura 4).

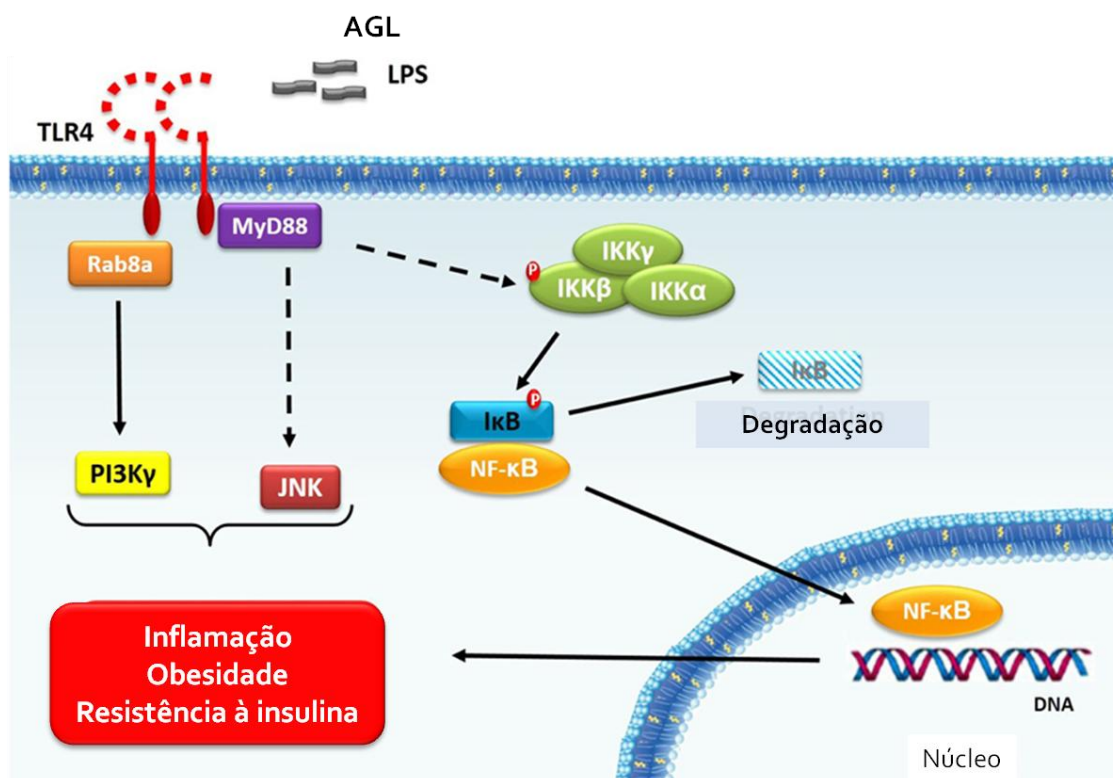


Figura 4. Ativação da via inflamatória, mediada por LPS. Adaptado de Cavalcante-Silva (2015). (CAVALCANTE-SILVA ET AL., 2015). LPS = lipopolissacarídeos; LBP = proteína de ligação; TLR4= receptor do tipo toll 4; MyD88 = gene de resposta primária de diferenciação mieloide 88; IRAK = quinase associada ao receptor de interleucina; TRAF = fator associado ao receptor de TNF; ERK= quinase de regulação extra-celular; Akt = Proteína quinase B; IKK IkB quinase; NFκB = fator nuclear kappa B; IL= interleucina; TNFα fator de necrose tumoral alfa.

Em relação à via inflamatória do NLRP3, estudos com utilização de imunofluorescência já mostraram que o tecido adiposo expressa componentes do inflamassoma e que estavam colocalizadas com macrófagos (VANDANMAGSAR ET AL.,

2011). A formação do complexo do inflamassoma consiste em NLRP3, caspase-1 e a *apoptosis-associated speck-like protein* (ASC) e envolve primeiramente a indução transcricional mediada por TLRs/NFkB do NLRP3 e das pro-citocinas IL-1 β e IL-18 e posteriormente da conversão dos precursores IL-1 β e IL-18 em citocinas ativas (RINGSEIS ET AL., 2015).

2.4 Exercício físico e PPAR- γ

Estudos recentes têm mostrado que o exercício aeróbio é capaz de contribuir de maneira positiva no quadro inflamatório-metabólico por reduzir a ativação do NF-kB no tecido adiposo de ratos induzidos a obesidade por dieta (DA LUZ ET AL., 2011). Adicionalmente, o exercício tem-se mostrado eficiente tanto na inibição do recrutamento como na alteração do perfil de macrófagos de pró-inflamatório (M1) para anti-inflamatórios (M2) (KAWANISHI ET AL., 2010). Essa polarização é dependente do microambiente como já foi descrito anteriormente e envolve alguns fatores de transcrição sensíveis a essas alterações, dessa forma controlar a transcrição de genes pode ser uma tentativa de recuperar a homeostasia. Dentre esses fatores podemos citar os fatores reguladores de interferon (IRFs), PPARs, HIFs e STATs (LAWRENCE & NATOLI, 2011).

Os benefícios do exercício físico em relação às diversas doenças relacionadas ao ganho de massa adiposa e inflamação crônica de baixo grau são promissores (PETERSEN & PEDERSEN, 2005; JOHANSEN & PAINTER, 2012; LINDEN ET AL., 2014). Todavia, com a descoberta de citocinas de ação anti-inflamatórias provenientes do exercício, esta relação com o sistema imunitário ficou ainda mais estreita (ULLUM ET AL., 1994). Como demonstrado por diversos grupos de pesquisa, tanto o exercício físico exaustivo, como o treinamento aeróbio moderado levam a um padrão de imunossupressão, desencadeado por uma importante resposta anti-inflamatória (WALSH ET AL., 2011), que são causadas por diversos fatores, dentre eles o aumento nas concentrações de cortisol e citocinas

causados pelo exercício. No entanto, o tempo de duração do estresse é um fator muito importante para determinar as consequências nas células do sistema imune. O estresse agudo originado por uma sessão de exercício pode ter um efeito protetor em longo prazo (treinamento) (NIEMAN & NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994), uma vez que ocorre uma redistribuição de células do sistema imunitário, aprimorando as células imunitárias inata e adaptativa. Dentre os mecanismos envolvidos na ação anti-inflamatória do exercício estão a redução na gordura corporal, a diminuição no recrutamento de macrófagos ao tecido adiposo, o aumento na produção de miocinas pelo músculo esquelético, assim como uma possível contribuição do sistema nervoso parassimpático na redução da frequência e variabilidade da frequência cardíaca (WOODS ET AL., 2006).

Considerando-se então, o papel do PPAR- γ (*peroxisome proliferator-associated receptor gamma*), como um coadjuvante no combate à resposta inflamatória do organismo, especialmente quando se trata de macrófagos, células nas quais esse fator de transcrição é altamente expresso, torna-se questionável a regulação do imuno-metabolismo em resposta ao treinamento físico e a participação do PPAR- γ nesse contexto. O PPAR- γ pertence à família de fatores de transcrição nucleares ativados por ligantes o receptor 9-cis ácido retinóico (RXR) e o receptor trans ácido retinóico (RAR) (JOHNSON ET AL., 2000), sendo altamente expresso em diferentes tecidos, como tecido adiposo, fígado e monócitos e estimula a transcrição de genes específicos do metabolismo lipídico (LEHRKE & LAZAR, 2005). Para que induzam a transcrição dos genes alvos, deve combinar-se com os receptores RXR, formando um heterodímero que se liga a sequências específicas de reconhecimento (PPREs) na região regulatória dos genes-alvo (Figura 5). O papel do PPAR- γ no tecido adiposo vai além da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, esse fator de transcrição também é um regulador da expressão gênica de numerosas proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos e inflamação (PLUTZKY, 2003).

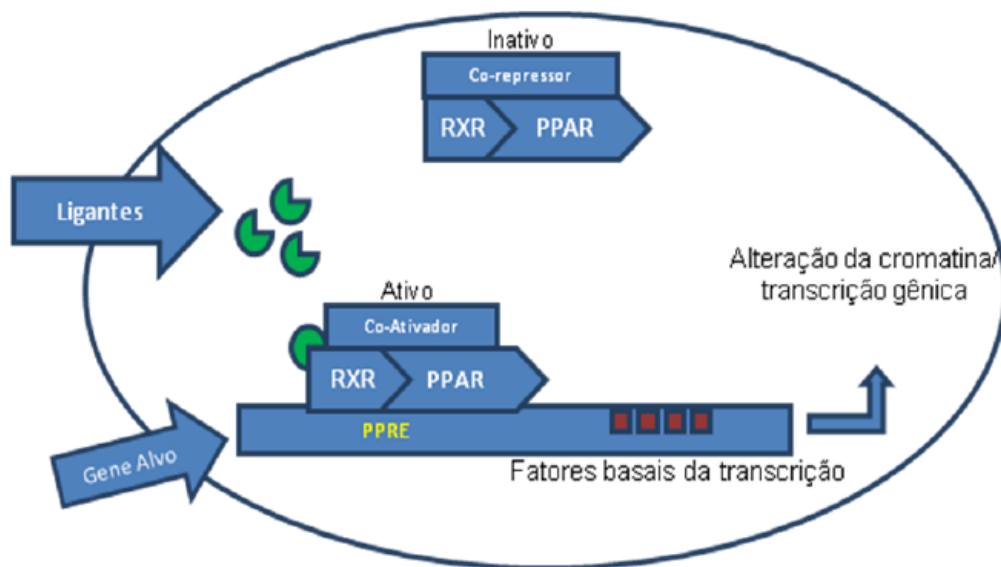


Figura 5. Mecanismo de ação do PPAR. RXR= receptor X retinoide; PPRE = elemento de resposta de proliferação peroxissomal; PPAR= receptor ativado por proliferador peroxissomal

São conhecidas algumas isoformas do PPAR- γ , sendo elas PPAR- γ 1, expressa em tecidos não adiposos e PPAR- γ 2, específico para adipócitos. Além disso, o PPAR- γ apresenta alguns agonistas endógenos, como ácidos graxos insaturados e eicosanoides, assim como agonistas sintéticos, como no caso de algumas drogas anti-diabéticas (STIENSTRA ET AL., 2007). As thiazolidinedionas (TZD) têm sido amplamente usadas no combate ao diabetes como potente sensibilizadores de insulina e agem como agonistas para o PPAR- γ tanto no tecido adiposo como em células do sistema imunológico alterando não apenas a produção de citocinas inflamatórias mas também como antioxidante (FUJIWARA & HORIKOSHI, 2000).

Genes alvo para o PPAR- γ parecem também estar envolvidos no processo de diferenciação de adipócitos, metabolismo de glicose e armazenamento de lipídeos (LEHRKE & LAZAR, 2005). Dickinson, et al (2008) (DICKINSON ET AL., 2008) verificaram que os ácidos graxos e glicose ativam a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) em monócitos, elevando a produção de citocinas pró-inflamatórias, por outro lado,

sabe-se que a ativação do PPAR- γ , contra-regulam a atividade do NF- κ B, reduzindo a produção de citocinas por monócitos, sugerindo que os processos inflamatórios mediados pelo NF- κ B estão intimamente relacionados com fatores de transcrição que controlam genes alvos do metabolismo de lipídeos (CHINETTI ET AL., 1998).

A deleção do PPAR- γ em células mielóides desestabiliza o metabolismo oxidativo característico da sua função M2 ou anti-inflamatória em função de uma redução na biossíntese mitocondrial (ODEGAARD ET AL., 2007), e apesar dos animais nocaute apresentarem quantidades menores de macrófagos no tecido adiposo, esse número foi reduzido especialmente em relação aos macrófagos M2, sugerindo a importância desse fator de transcrição na polarização de macrófagos com características anti-inflamatórias.

Diversos autores sugerem que a ativação PPAR- γ durante o exercício constitui um novo e potente fator anti-inflamatório e anti-aterogênico (BUTCHER ET AL., 2008; YAKEU ET AL., 2010; THOMAS ET AL., 2012; RUFFINO ET AL., 2016). No entanto, são incipientes os estudos sobre a relação imuno-metabólica e a participação do PPAR- γ , principalmente os mecanismos moleculares e fisiológicos modulados pela ausência do gene ou envolvimento em programas de exercícios físicos. Dessa forma não há um protocolo ou modelo a ser seguido que indique a melhor intensidade ou volume de treino.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Verificar a participação do fator de transcrição gênica PPAR- γ , como possível regulador chave na interação imuno-metabolismo em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento aeróbico moderado.

3.2 *Objetivos Específicos*

Avaliar em camundongos PPAR- γ Lyz Cre^{-/-} (WT) e PPAR- γ Lyz Cre^{+/+} (KO) os efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento aeróbico, sobre:

- Composição corporal, desempenho em teste máximo e consumo energético;
- Variáveis metabólicas, perfil lipídico e homeostase glicêmica, por meio de análises no soro e testes de tolerância a glicemia e a insulina;
- Morfologia dos tecidos adiposos;
- Imunofenotipagem de macrófagos infiltrados no tecido adiposo, bem como o conteúdo de citocinas no tecido total e em adipócitos isolados;
- Cultura *ex vivo* de macrófagos da cavidade peritoneal com estímulo de LPS, avaliando a imunofenotipagem e a produção de citocinas, além de expressão gênica de genes inflamatórios.

4. HIPÓTESE

Embasados na atual eficácia do exercício como um dos mecanismos de prevenção e/ou tratamento da inflamação crônica de baixo grau, a pergunta central da presente tese está na importância do PPAR- γ para a usual resposta anti-inflamatória decorrente do exercício físico moderado crônico. Nossa hipótese é de que células importantes para o sistema imunológico, como os macrófagos, se desafiados a uma situação de dificuldade de polarização alternativa (M2), como a falta do fator de transcrição PPAR- γ , ainda manteriam a mesma imunomodulação de um animal sem a deleção do PPAR- γ .

5. MATERIAS E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos LysM-cre com linhagem background C57BL/6 e PPAR- γ floxed (PPAR- $\gamma^{\text{flox/flox}}$) foram gentilmente cedidos pelo Professor William Festuccia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e então cruzados para gerar camundongos com deficiência de PPAR- γ em células mielóides. O promotor LysM é ativo em células mielóides e promove a deleção do PPAR- γ em macrófagos de camundongos LysM-Cre PPAR- $\gamma^{\text{flox/flox}}$. Foram utilizados dois genótipos de animais no presente estudo, Lysozim Cre para PPAR- γ LysCre $^{+/+}$ PPAR- $\gamma^{-/-}$ (KO) e camundongos controle da mesma ninhada LysCre $^{-/-}$ PPAR- $\gamma^{+/+}$ chamados por convenção como tipo selvagem (WT) (Figura 6). Os animais foram mantidos em caixas com 2-3 animais, numa sala com ciclo claro-escuro de 12/12 horas e a uma temperatura de 23 ± 2 ° C, com ração (ração Nuvital Nuvilab, Colombo, PR) e água *ad libidum* até ao início do tratamento (6 a 8 semanas de vida). Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas (112 / 13CEUA).

Para cada genótipo foram formados quatro grupos (n = 8-10 animais por grupo): 1) sedentário alimentado com dieta controle; 2) alimentados com dieta controle, e submetido a treinamento de intensidade moderada (T); 3) sedentário e alimentados com dieta rica em gordura (HF); 4) alimentado com dieta HF, e submetido a treinamento de intensidade moderada (HFT).

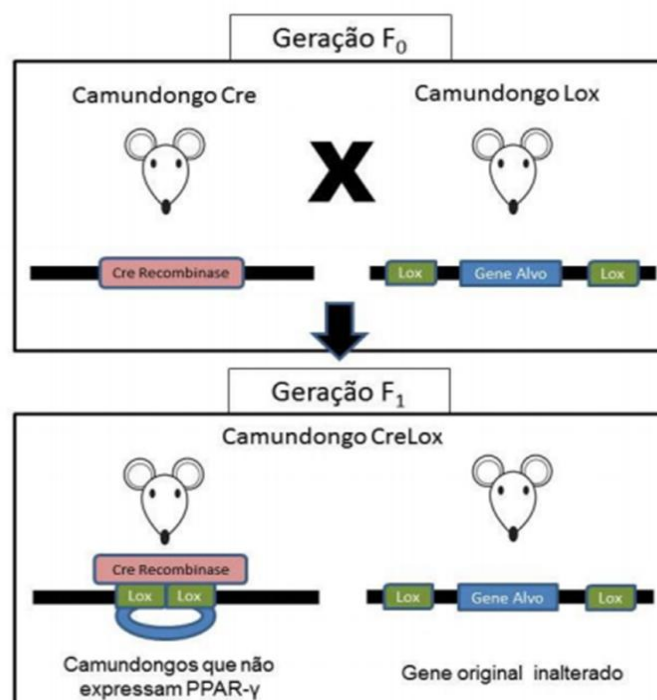


Figura 6. Modelo experimental genético do sistema CreLox no qual o gene alvo é interrompido originando um animal nocaute condicional.

5.2 Genotipagem

Camundongos tiveram aproximadamente 0,2 cm de sua cauda cortada após anestesia com isoflurano. A extração do DNA caudal foi realizado por digestão com NaOH (50 mM) por 12 minutos a 95 °C, seguido de neutralização com Tris-HCl (1M, pH 6,8) e centrifugação por 15 min à 13000 rpm. O sobrenadante desta solução foi utilizado para PCR com kit Platinum TAQ DNA polimerase (*Invitrogen*). As amostras foram corridas em gel de agarose 1,5% para a separação dos produtos de PCR e comparadas ao padrão de peso molecular de 100 bp. Os primers utilizados para genotipagem dos camundongos foram: PPAR- γ lox (selvagem com banda de 200 bp e mutante com banda em 230 bp): sense oIMR1934 (5'-TGTAATGGAAGGGCAAAGG-3') anti-sense oIMR1935 (5'-TGGCTTCCAGTGCATAAGTT-3'); Enzima CRE (controle interno com produto em 324 bp e mutante com banda em 225 bp: sense (IMR7338)

CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT (antisense oIMR7339)
 GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC; ADIPOQ-CRE 225BP sense
 ACGCGTTAATGGCTAATCGC anti-sense GGCGCTAAGGATGACTCTGG.
 ADIPOQ-CRE 202BP :sense CGA ACG CAC TGA TTT CGA CC anti sense AAC
 CAG CGT TTT CGT TCT GC.

5.3 Dieta

Os animais receberam a dieta durante 12 semanas, tempo total de experimento. Ao longo do período, foram monitorados a ingestão alimentar (pesagem da ração consumida a cada três dias) e peso corporal semanal. A dieta controle foi composta somente de ração padrão Nuvilab CR-1 (Nuvital Nutrientes S/A) sendo sua composição básica: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, mix vitamínico mineral e aminoácidos. A dieta hiperlipídica teve sua composição básica de: bitartarato de colina, L-Cistina, mix de vitaminas, mix de minerais, celulose microfina, sacarose, amido de milho, amido dextrinizado, caseína, gordura vegetal hidrogenada, óleo de girassol [ômega 6]. As informações nutricionais são apresentadas na **Quadro 1** e sua composição na **Quadro 2**. Foi calculada a eficiência alimentar dos animais segundo a equação: $(\text{ganho de peso semanal (g)} / \text{Kcal semanal ingerida}) \times 100$.

Quadro 1. Informação nutricional das dietas (Porção de 100g)

Ração padrão Nuvilab CR-1		
Valor energético	339 kcal = 1418 kJ	Quantidade por porção (%VCT*)
Carboidratos	54 g	63,4 %
Proteínas	22 g	25,9 %
Lipídios	4 g	10,6 %
Dieta Hiperlipídica		
Valor energético	536,2 kcal = 2242,9 kJ	Quantidade por porção (%VCT*)
Carboidratos	34,75 g	25,9 %
Proteínas	20,55 g	15,3 %
Lipídios	35 g	58,7 %
* % do valor calórico total		

Quadro 2. Composição da dieta hiperlipídica

Ingredientes	Dieta hiperlipídica com gordura vegetal hidrogenada (gramas)
Bitartarato de colina	2,5
L-Cistina	1,8
Mix de vitaminas	10
Mix de minerais G	35
Celulose microfina	50
Sacarose	223,75
Amido de milho	57,75
Amido dextrinizado	66
Caseína	200
Gordura vegetal hidrogenada	315
Óleo de girassol	40
Total	1001,8

5.4 Protocolo de treinamento

Os animais realizaram o treinamento aeróbio na esteira ergométrica com choque elétrico a aproximadamente 60% da velocidade máxima (teste de velocidade máxima realizado previamente), cinco dias na semana durante 60 minutos da 5ª a 12ª semana de dieta (adaptado de Bacurau (2003) (2007) (BACURAU ET AL., 2003; BACURAU ET AL., 2007) (**Figura 7**))

Na 4ª semana de dieta os animais foram adaptados na esteira rolante por cinco dias, caminhando a 10 metros por minuto durante 10 minutos. O teste máximo foi realizado ao final da 4ª semana (antes do início do treinamento para determinar a carga de treino inicial), na 8ª semana para o ajuste da carga de treino e na 12ª semana para verificar se houve alguma melhora. Os animais com maiores e menores velocidades foram selecionados para a realização do protocolo de treinamento

Protocolo do teste máximo

Os animais realizaram aquecimento, caracterizado por 5 minutos na velocidade de 10 metros/minuto (m/m), com início do teste a partir do sexto minuto, aumentando a velocidade em 3m/m a cada minuto. A exaustão foi considerada por alterações biomecânicas na corrida do animal.

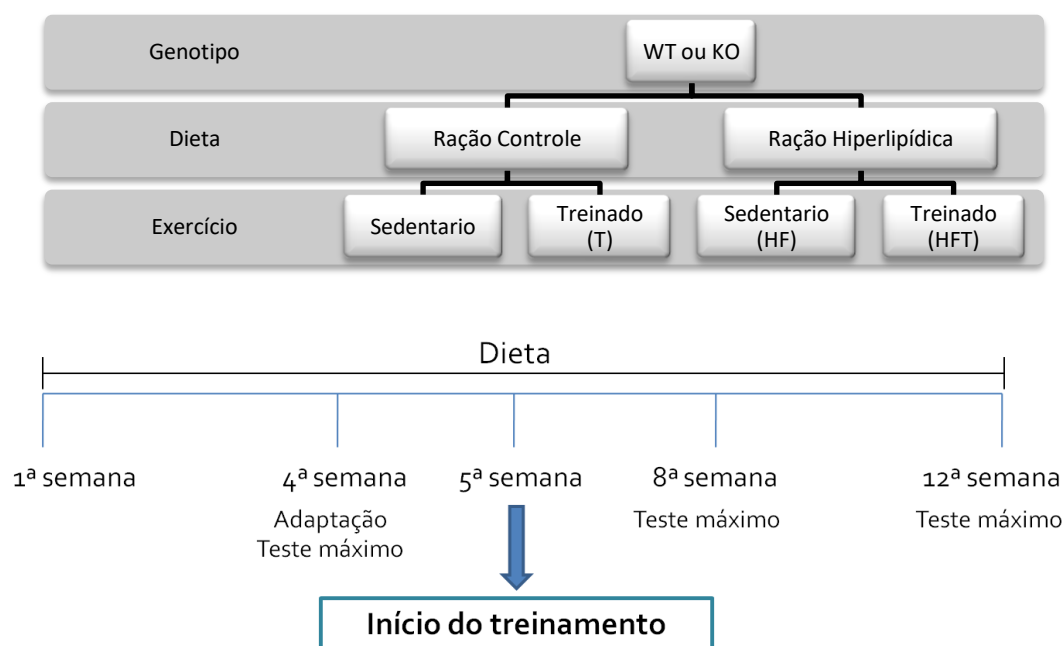


Figura 7. Delineamento do estudo

5.5 Testes de tolerância à glicose e insulina

Ao início da 12ª semana de protocolo os animais ficaram em jejum durante 6 horas e receberam uma injeção intraperitoneal de insulina (0,375UI/kg de peso corporal)

ou D-glicose (2 g/kg de peso corporal). Para o teste de tolerância à insulina, as amostras de sangue foram coletadas a partir da veia da cauda antes da injeção e aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção de insulina. A constante de decaimento da glicose sérica (KiTT) foi calculada pela fórmula $0,693/T_{1/2}$, onde $T_{1/2}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela regressão linear das concentrações de glicemia medidos entre 5 e 30 minutos após a injeção de insulina (BONORA ET AL., 1989). Da mesma forma, para o teste de tolerância à glicose, amostras de sangue foram coletadas da veia da cauda antes e aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose (BERGMEYER, 1973). As diferenças na glicemia antes e durante a administração de glicose foram usadas para calcular as áreas sob a curva (AUC). Houve intervalo de 72 horas entre os testes e os animais realizaram o treinamento aeróbico após os testes GTT e ITT. As concentrações de glicose foram medidas utilizando o glicosímetro Accu-Chek® (Roche®, São Paulo, SP, Brasil).

5.6 Eutanásia e coleta de amostras

Após doze semanas do tratamento, os camundongos foram pesados e eutanasiados por decapitação, após jejum de 6 horas. Imediatamente após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos de plástico para análises plasmáticas. Os macrófagos peritoneais foram coletados para realização da cultura celular. Os tecidos adiposos branco inguinal (subcutâneo), epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram dissecados, para obtenção do índice de adiposidade (soma dos tecidos adiposos branco subcutâneo, retroperitoneal e epididimal) e posterior análises de expressão gênica e proteica. Também foram coletados o fígado, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo marrom.

5.7 Análises Plasmáticas

Os tubos de sangue foram centrifugados a 3000 rpm, durante 15 minutos à 4 °C. A seguir, o plasma foi armazenado em microtubos plásticos eppendorfs e estocados à – 80 °C para posterior análise. As concentrações de glicose, triacilglicerol e colesterol total foram analisados por método colorimétrico, obtidos da empresa Labtest®, Brasil. Ácidos graxos livres foram mensurados pelo kit WAKO®. Foi utilizado o método *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) para dosagens das concentrações de insulina (Merck Millipore®) e para dosagem das citocinas IL-1 β , IL-1ra, IL-6, TNF- α e IL-10 (R&D System®, Inc., Minneapolis, USA).

5.8 Extração de ácidos graxos do fígado

Os lipídeos do fígado foram extraídos com clorofórmio-metanol (1:3), conforme descrito por Folch e colaboradores (1957) (FOLCH ET AL., 1957) e as concentrações de triacilglicerol da extração foram determinados por ensaios enzimáticos da Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil).

5.9 Citrato Sintase

A atividade da CS foi determinada usando 5. 5'ditiobis – (ácido 2-nitrobenzóico DTNB) (ALP ET AL., 1976) utilizando-se o músculo (sóleo) homogeneizados em 100 mM Tris, pH 8,0, 0,1 mM acetil-CoA, 0,1 mM 5,5'-ditiobis-(2 ácido nitrobenzóico), 0,1% triton X-100. 2 μ g de proteína sobrenadante foram utilizados para a reação que foi iniciado com oxaloacetato 0,2 mM e monitorado com 412 nm por 3 minutos a 25°C.

5.10 Cultura de macrófagos

A coleta dos macrófagos peritoneais foi realizada logo após a eutanásia do animal. Foram aplicados seis mililitros de meio de cultura (RPMI-1640 enriquecido com Glutamina 2mM, bicarbonato de sódio 24mM, HEPES 20mM, 10% soro fetal

bovino e antibióticos - 10000U/ml de penicilina e 10000U/ml de estreptomicina) na cavidade intraperitoneal do animal e coletado em seguida um volume aproximado de 4-5ml do meio. Após centrifugação e homogeneização das células em 1mL de RPMI, a determinação do número de células por mililitro foi realizada por meio de hemocítmetro (Câmara de Neubauer). A concentração celular foi ajustada em $1-2 \times 10^5$ e as amostras foram mantidas por 2h em placa em incubação adequada. Durante este período os macrófagos aderiram à placa e a sub-população de linfócitos ficou dispersa no sobrenadante, permitindo assim a separação destas células pela retirada do meio. Os macrófagos peritoneais aderidos à placa foram mantidos em RPMI (10% soro) e tratados ou não com LPS ($2,5 \mu\text{g/mL}$) (ZHANG ET AL., 2008). Após 24h de incubação, tanto o meio quanto os macrófagos foram coletados e estocados a -80°C , para análises posteriores. No meio de cultura foram determinadas as concentrações de TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1ra e MCP-1 com kit de ELISA comercial (R&D System[®]).

5.11 Cortes histológicos

Os tecidos analisados foram removidos, fixados em formaldeído a 4% (tampão fosfato) com pH 7,4, por um período de aproximadamente 24 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados em xilol e incluídos em parafina a 60°C . Posteriormente, os blocos de parafina contendo os tecidos foram cortados em um micrótomo (Leica[®], Alemanha), gerando cortes de $5 \mu\text{m}$ de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). Para a análise histológica, foi utilizado um sistema de análise de imagem que consistiu de uma câmara digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) ligada a um microscópio de luz (Eclipse 400, Nikon). Imagens de alta qualidade (2048×1536 pixels) foram capturadas com o ImagePro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics) e quantificados as áreas

perímetros e diâmetros dos adipócitos pelo Software Fiji (ImageJ) Madison, Wisconsin, USA - Adiposoft (SCHINDELIN ET AL., 2012).

5.12 Purificação de células infiltradas no tecido adiposo e avaliação de fenótipos celulares por citometria de fluxo

Para a purificação de células do tecido infiltração de gordura, o tecido adiposo foi incubado com colagenase tipo I (2 mg/ml; Sigma-Aldrich®) em PBS com EDTA (2 mM, Sigma-Aldrich®) durante 1 hora a 37 ° C. A suspensão foi filtrada utilizando um filtro de células a 100 micrometros. A solução foi sujeita a gradiente de Percoll para a purificação de leucócitos. Depois de gradiente de Percoll, as células foram lavadas com PBS e coradas com o painel de anticorpos (**Quadro 3**). Para a identificação de macrófagos foram utilizados os marcadores F4/80⁺ e CD11b⁺ dentro da população CD45⁺. Dentro da população de macrófagos as subpopulações CD11c⁺ CD206⁻ foram consideradas M1 e as CD206⁺ CD11c⁻ consideradas M2

Os macrófagos peritoneais foram purificados por adesão em placa de 24 poços (5x10⁵ células) e caracterizados pela expressão concomitante de marcadores de macrófagos (F4/80⁺CD11b⁺). Dentro desta população de macrófagos, as células que expressavam CD206⁺CD86⁻ foram consideradas como de fenótipo M2 e as que expressavam CD86⁺CD206⁻ como M1. A caracterização de subpopulações de leucócitos foi realizada na máquina CANTOII FACS (BD, Beckton Dickson, NJ, EUA) e a análise dos dados foi realizada com software 9.5.3 FlowJo (Treestar).

Quadro 3. Anticorpos utilizados para análise de moléculas de superfície de macrófagos

Anticorpo	Função	Fluorescência	Titulação	Marca
anti-CD45	Antígeno comum de leucócitos - regulador de sinalização de receptores de antígeno	PercP	1:100	BioLegend®, CA, EUA
anti-CD11b	Interações adesivas de monócitos, macrófagos e granulócitos	APC-Cy-7	1:100	BioLegend®, CA, EUA
anti-F4/80	Receptores acoplados a proteína G de aderência	PE	1:100	BioLegend®, CA, EUA
anti-CD11c	Interação célula-célula durante as respostas inflamatórias	APC	1:100	BioLegend®, CA, EUA
anti-CD206	Receptor de manose - Receptor de patógeno, Endocitose	FITC	1:100	BioLegend®, CA, EUA
anti-CD86	Molécula co-estimuladora	PE-Cy-7	1:100	BioLegend®, CA, EUA

5.13 Isolamento de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real

O RNA total das células em cultura foi extraído utilizando-se reagente TRIZOL® como descrito por Chomczynski e Sacchi (1987) (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987), quantificado em um espectrofotômetro (260 nm/280 nm) e o cDNA foi sintetizado a partir de RNA total usando transcriptase reversa realizada usando o kit de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA). A sequência de primers foi mostrada na Quadro 4, e a expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real, utilizando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) como corante fluorescente. O método comparativo descrito por Livak (2001) utilizando a expressão de 36B4 como controle endógeno (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Quadro 4. Primers utilizados para expressão gênica em macrófagos peritoneais

Gene	Sense	Anti-sense
36B4	GGCCAATAAGGTGCCAGCT	TGATCAGCCCGAAGGAGAAG
TLR4	AGTCAGCAACGTGGAAGGT	CGTCATGGGTGGTTTCTT
HIF-1 α	CAGCAAAGTCCCTGATGACA	TCCAGCCACTGAAGTTCTA
NFkB	CCAACTGGCAGGTATTTGAC	GCTGCTTCATGTCCCCTTG

5.14 Análise dos resultados

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por ANOVA *Two-Way* seguida pelo *post test* de *Bonferroni*. Para comparações entre células M1 e M2 foi utilizado o teste *t não* pareado. Nos testes de tolerância a glicose e insulina utilizou-se o teste de medidas repetidas. Em todas as análises foi adotado o nível de significância a 5% ($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando os programas *GraphPad Prism* version 6.0 for Windows (GraphPad Software v. 6.0, San Diego California USA.).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes de alocados em seus grupos experimentais os animais foram identificados geneticamente quanto à presença da enzima responsável pela deleção específica do fator de transcrição PPAR- γ em células mieloides (**Figura 8**).

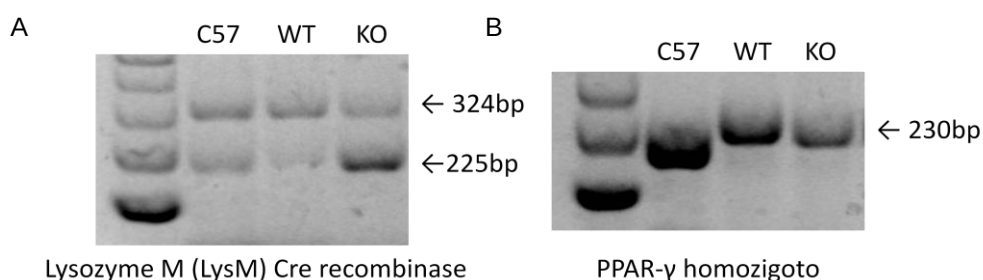


Figura 8. Características genóticas de camundongos nocaute condicional para PPAR- γ em células mieloides. A análise por PCR do DNA genômico isolado da cauda partir de controle [C57BL/6 (C57); gene PPAR- γ identificado lox LysCre-/-PPAR- γ +/+ (WT) e LysCre+/+PPAR- γ -/- (KO). Uma escala de 100 pb de DNA foi usado como um padrão de tamanho. No painel A, a banda de 225 pares de base refere-se a presença da enzima Cre recombinase, enquanto a banda de 324 pares de base ao controle positivo. No painel B, a banda de 230 pares de base refere-se a presença da mutação (WT e KO) enquanto o C57 apresenta banda de 200 pares de base.

Para uma melhor explanação dos resultados, os mesmos foram divididos em três partes: primeiramente foram comparados os genótipos dos animais sedentários e treinados em alimentação padrão (Capítulo 1), em uma segunda etapa foi induzida a obesidade por dieta hiperlipídica para comparação do efeito da deleção do fator de transcrição em animais obesos (Capítulo 2), e por fim, os animais obesos de ambos os genótipos foram submetidos ao treinamento aeróbio moderado (Capítulo 3).

6.1 CAPÍTULO 1

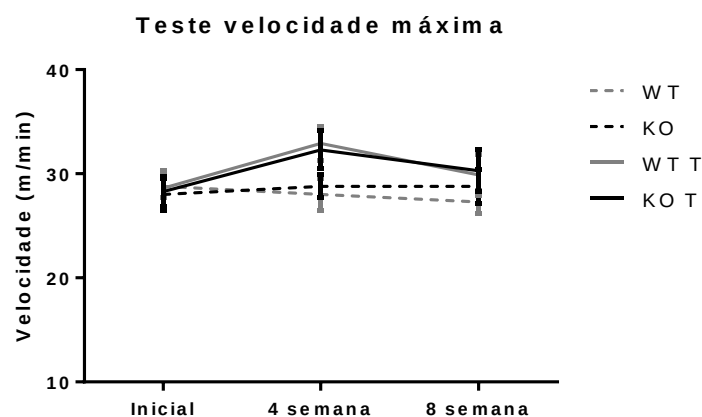


Figura 9. Efeito da deleção do PPAR- γ e treinamento sobre o a velocidade máxima atingida no teste máximo em esterira. Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10 por grupo). (ANOVA two-way seguido de *Bonferroni*, $p < 0,05$)

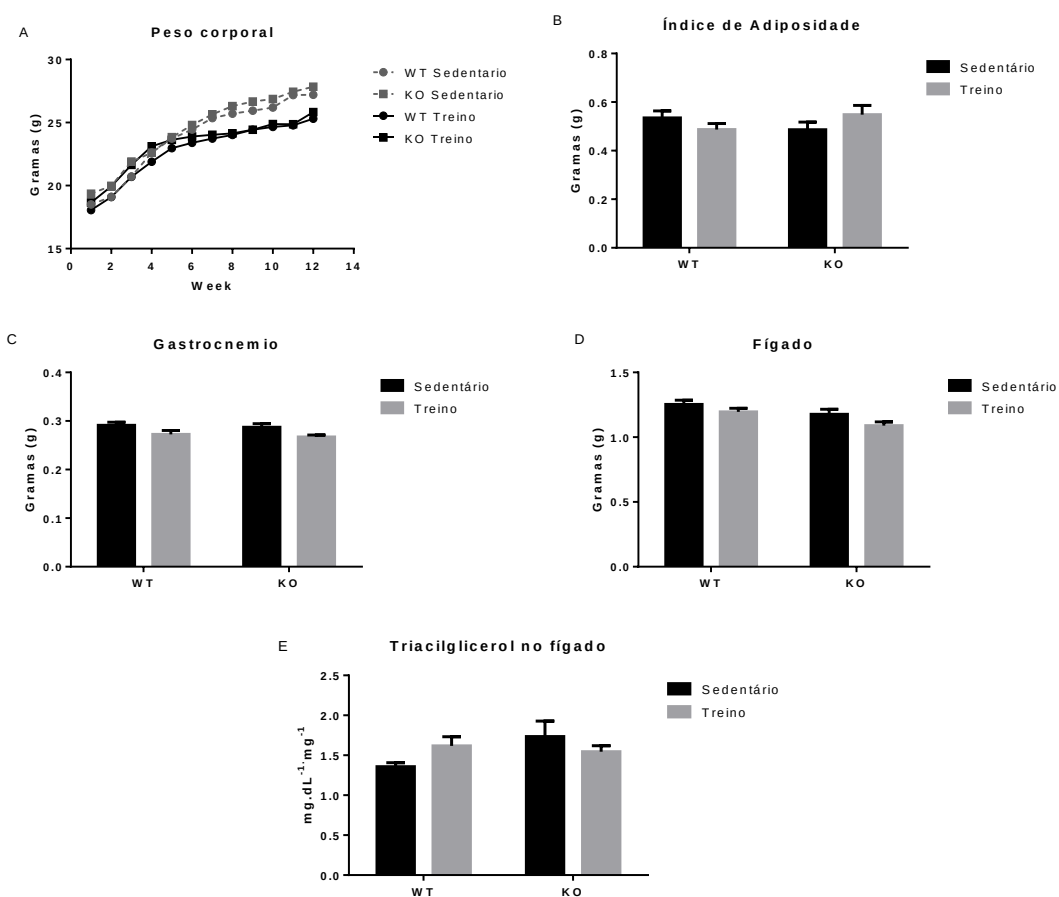


Figura10. Variáveis de composição corporal dos camundongos WT e KO sedentários e treinados. Peso corporal semanal ao longo do protocolo (A), índice de adiposidade (B) peso final do gastrocnêmio (C), fígado (D) e conteúdo de triacilglicerol no fígado (E). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10 por grupo). (ANOVA two-way seguida de *Bonferroni*) * $p < 0,05$.

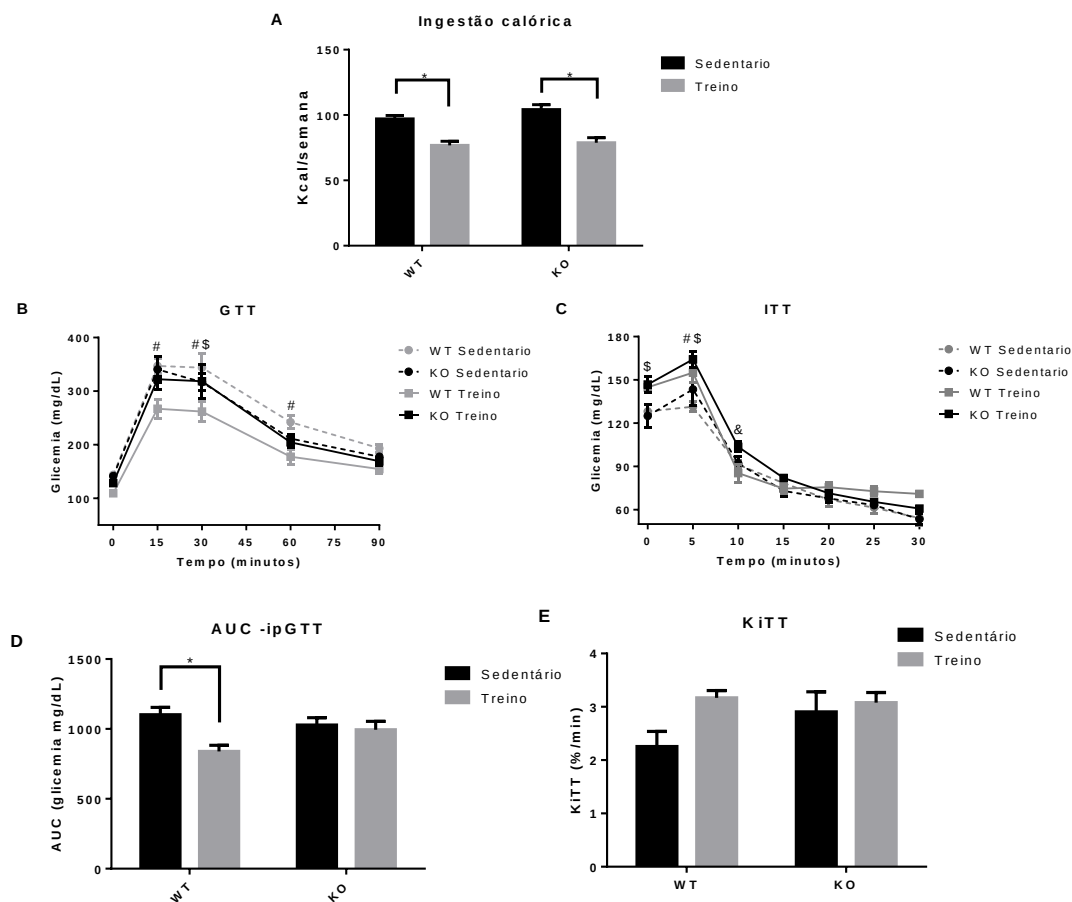


Figura11. Efeito de deleção de PPAR- γ e do treinamento na ingestão calórica, homeostase glicêmica e resistência à insulina. Consumo calórico semanal (A) glicemia durante teste de tolerância à glicose via intraperitoneal (ipGTT) (B), glicemia durante teste de tolerância à insulina via intraperitoneal (ipITT) (C), área sob a curva AUC (D) e constante de decaimento da glicemia (KITT) (E). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10 / grupo). (ANOVA Two-way seguida de post test de *Bonferroni* ou ANOVA medidas repetidas) # = WT Sedentary versus WT trained; \$ = KO Sedentary versus KO Trained; & = WT Trained versus KO Trained; *p < 0.05; ***p < 0.001..

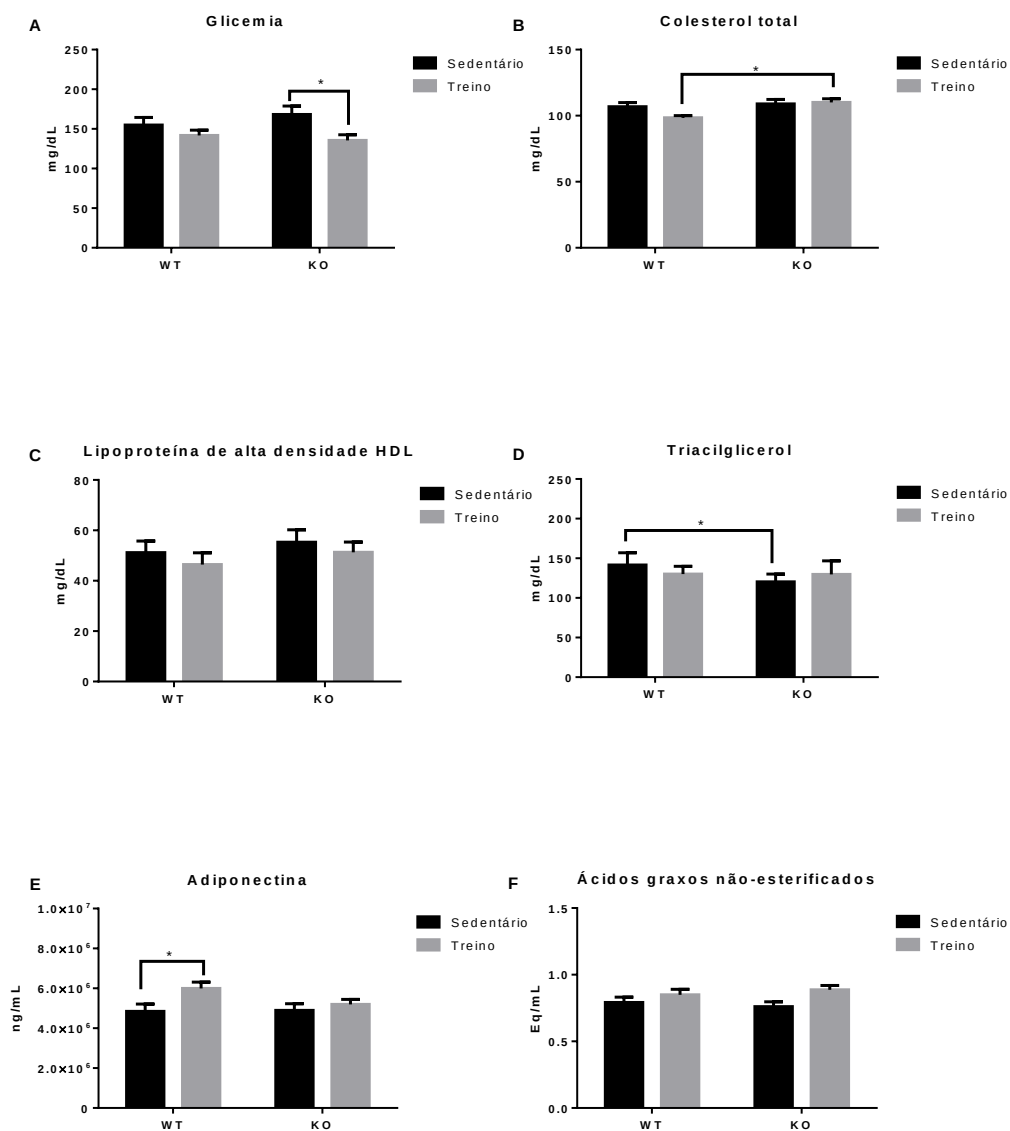


Figura12. Efeito de supressão de PPAR- γ sobre variáveis séricas de camundongos sedentários e treinados. As concentrações séricas de glicose (A), colesterol total (B), adiponectina (C) e triacilglicerol (D). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10/grupo (ANOVA two-way seguido de *Bonferroni*) *p < 0,05.

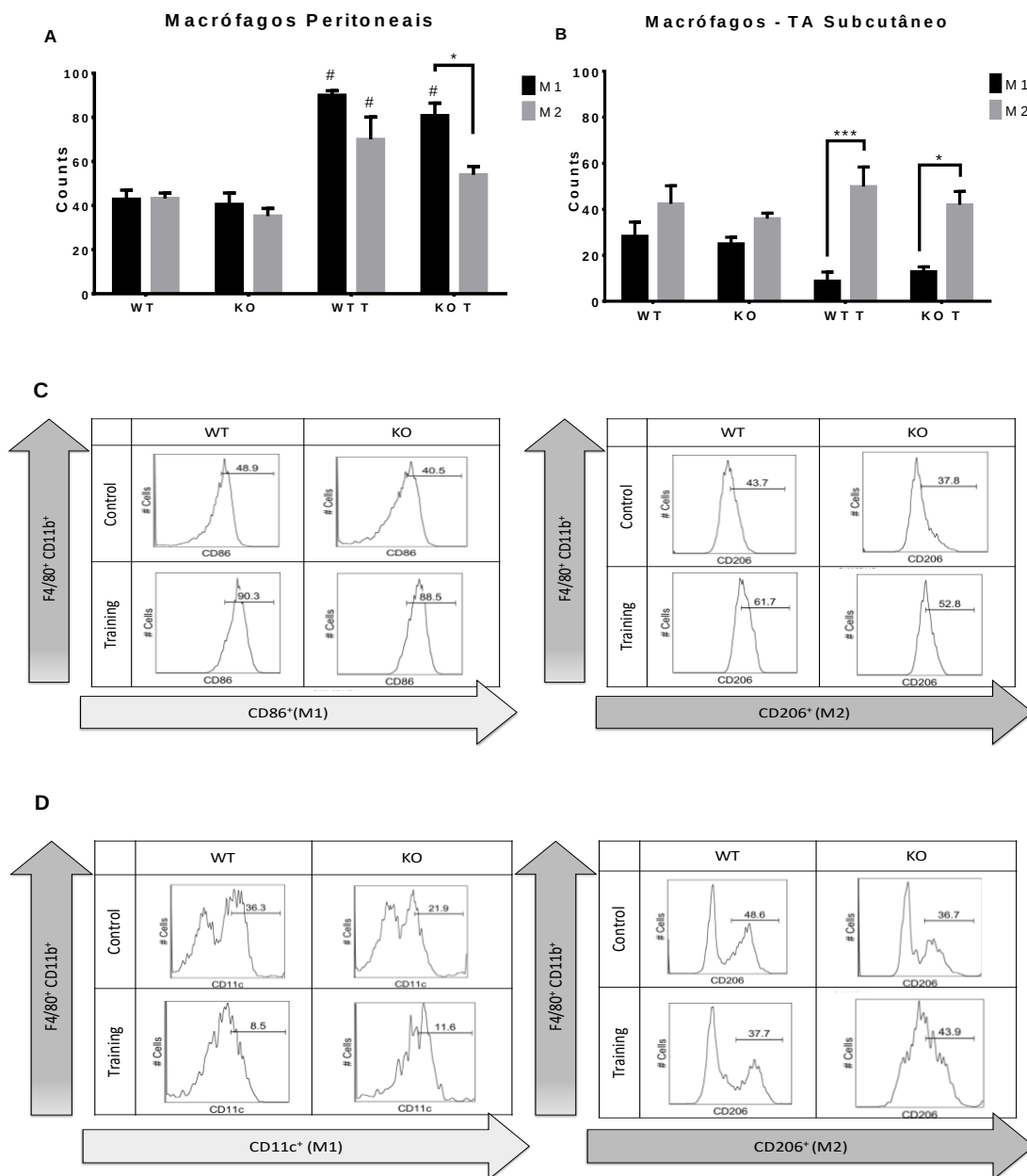


Figura 13. Efeitos do exercício moderado em marcadores de polarização de macrófagos em camundongos com deleção de PPAR- γ em células mielóides (KO) e controles (WT). Citometria de fluxo de macrófagos peritoneais isolados (A) e da porção estromal de tecido adiposo subcutâneo enzimaticamente digerido (B). As células foram identificadas por CD45. Foi utilizada uma estratégia de marcação sequencial para identificar populações expressando marcadores específicos ($F4/80^+ CD11b^+$), seguida da identificação de populações com padrões de expressão: macrófagos peritoneais M1 ($CD86^+$), M2 ($CD206^+$) (C) e macrófagos do tecido adiposo M1 ($CD11c^+$) macrófagos M2 ($CD206^+$) (D). # = diferente de mesmo genótipo sedentário; * $p < 0.05$; *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

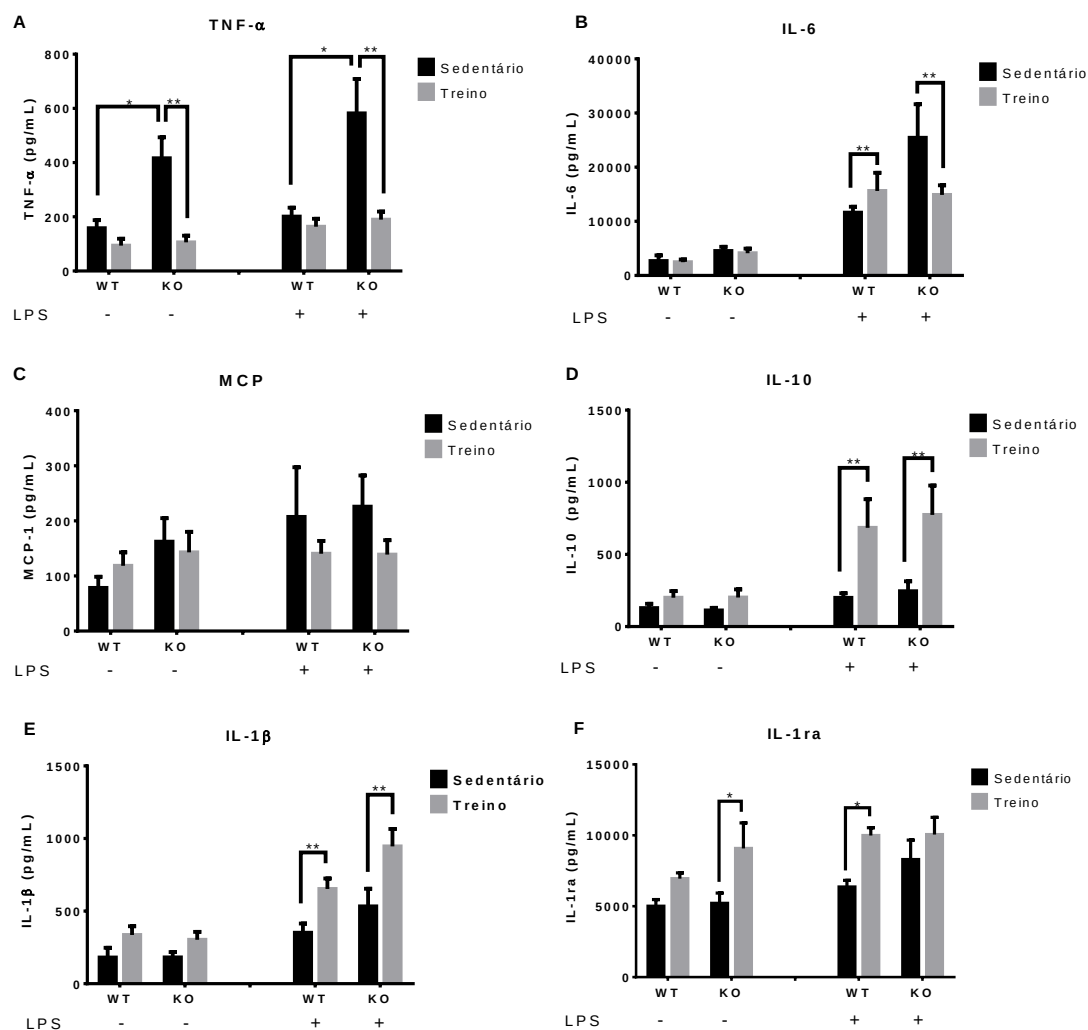


Figura14. Produção de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos WT e KO sedentários e submetidos ao treinamento, estimulados ou não por LPS (2,5µg/mL). Fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1), interleucina-1β (IL-1β), interleucina-10 (IL-10) e receptor antagonista de interleucina-1(IL-1ra) foram determinadas por ELISA no meio de cultura (n=8-10 por grupo). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. (ANOVA Two-way seguido de *Bonferroni*). a= diferente do WT b= diferente de KO. p < 0,05

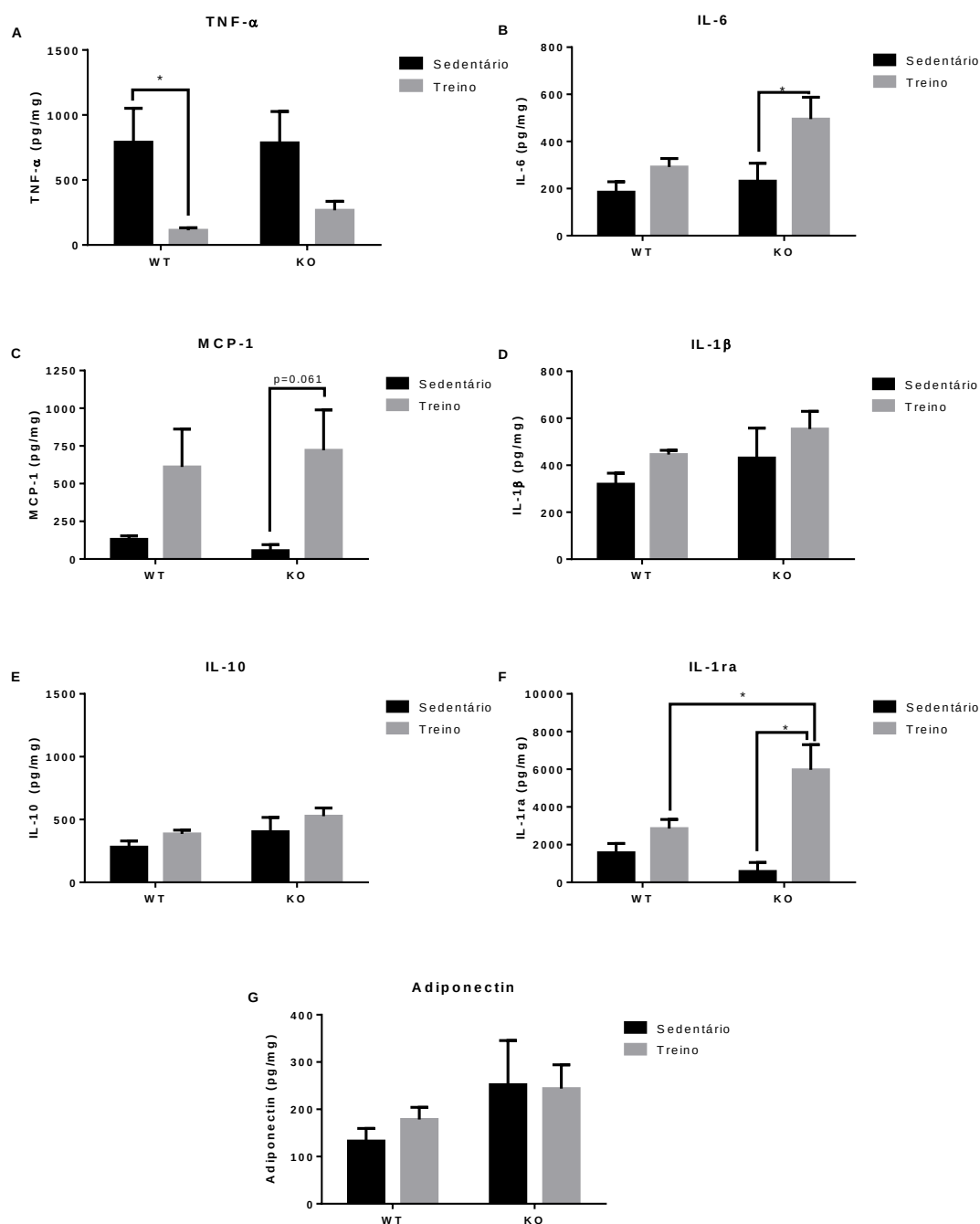


Figura 15. Conteúdo de citocinas no tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO sedentários e submetidos ao treinamento. Expressão do fator de necrose tumoral α (TNF- α) (A), interleucina-6 (IL-6) (B), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (C), interleucina-1 β (IL-1 β) (D), interleucina-10 (IL-10) (E), receptor antagonista de interleucina-1 (IL-1ra) (F) e adiponectina (G). As concentrações de citocinas no tecido foram determinadas por ELISA e relativizada por proteínas totais (n =8-10 por grupo). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (ANOVA Two-way seguido de *Bonferroni*). * p < 0,05

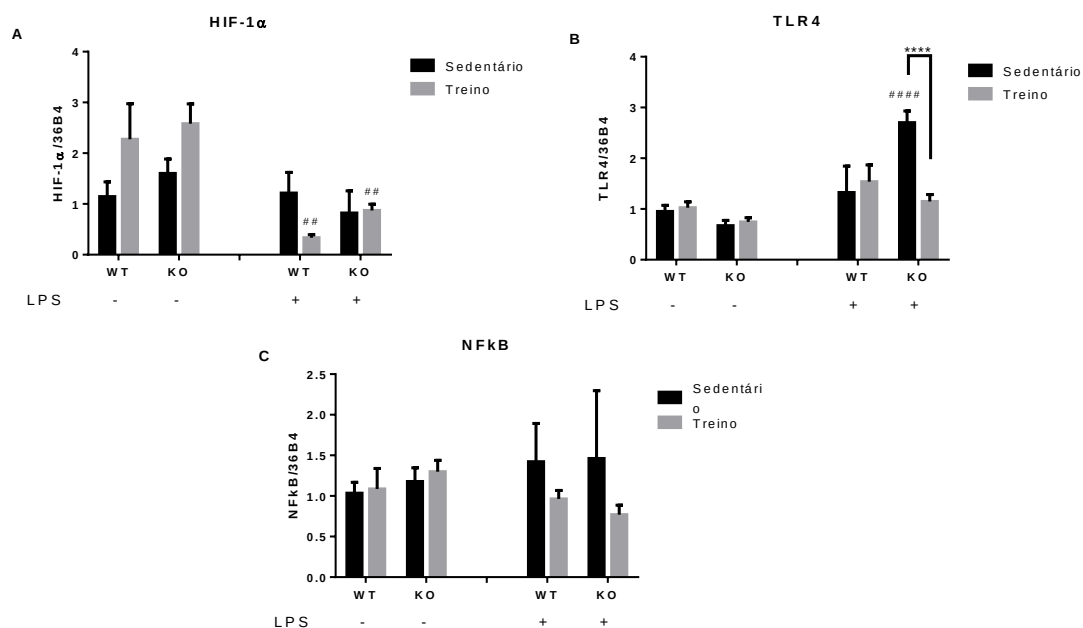


Figura 16. Expressão de genes envolvidos em vias inflamatórias em macrófagos peritoneais estimulados ou não por LPS. Fator indutível de hipóxia 1- α (HIF-1 α) (A), receptor Toll-4 (TLR4) (B) e fator nuclear kappa B (NF κ B) (C). Os dados são mostrados como média $\pm$ erro padrão da pasta média. (Two-way ANOVA seguido por *Bonferroni*). # = diferente do *** não estimulado **** p < 0,0001.

6.1.1 Composição corporal e desempenho não se alteram com a deleção do PPAR- γ em células mieloides

Primeiramente analisamos a ingestão calórica dos camundongos ao longo do protocolo. Apesar de uma considerável redução na ingestão calórica em ambos os genótipos de camundongos treinados (**Figura11**), não foram encontradas alterações significativas no peso corporal ou no índice de adiposidade (**Figura10**). Todos os animais foram submetidos ao teste de velocidade máxima em três momentos do protocolo e houve tendência de aumento da velocidade máxima no teste 2 [4 semanas] nos grupos treinados, mas essa tendência não se estendeu ao teste final [8 semanas] (**Figura 9**)

6.1.2 Treinamento melhora parâmetros metabólicos

Em relação à homeostase da glicose, foi realizado um teste de tolerância à glicose e teste de tolerância à insulina e observou-se que apenas o WT, quando treinado, diminuíram a área sob a curva (AUC) (**Figura11**) e sensibilidade à insulina pelo aumento do KITT (**Figura11**). Para acessar o perfil lipídico, foram realizados métodos colorimétricos utilizando soro isolado. Quando comparadas as diferenças genótípicas entre animais sedentários, foi observada menor concentração de triacilglicerol em camundongos KO (**Figura12**). Por outro lado, o exercício conseguiu equilibrar essa diferença nos grupos treinados. Além disso, os camundongos KO, quando treinados, reduziram a glicemia (**Figura12**), por outro lado aumentaram o colesterol total quando comparados aos treinados em WT (**Figura12**). A adiponectina foi significativamente maior apenas em camundongos WT quando exercitados (**Figura12**). Lipoproteínas de alta densidade e ácidos graxos não-esterificados não apresentaram diferenças entre genótipos ou treinamento (**Figura12**).

6.1.3 Treino restaura resposta imune na ausência de PPAR- γ em células mieloides

A citometria de fluxo foi utilizada para identificar os marcadores de superfície M1 e M2 em macrófagos peritoneais e associados ao tecido adiposo. Não houve diferença entre marcadores M1 e M2 dos camundongos sedentários WT e KO nas duas subpopulações de macrófagos (**Figura 13**). Exercício exacerba macrófagos peritoneais M1 e M2 em WT, mas as células KO não conseguem elevar marcadores M2 (**Figura 13 A**), já nos macrófagos do tecido adiposo houve uma população significativamente maior de células M2 independente do genótipo (**Figura 13 B**)

Em seguida, foi analisado o conteúdo de citocinas pró e antiinflamatórias do tecido adiposo subcutâneo. Não foram observadas diferenças entre os genótipos nos grupos sedentários (**Figura 15**). O treinamento físico foi capaz de reduzir a citocina pró-

inflamatória TNF α em WT (**Figura 15**). Camundongos KO exercitados apresentaram tendência à elevação da MCP-1 ($p=0,061$) quando comparados ao KO sedentário (**Figura 15**) e aumento de IL-6 e IL-1ra quando comparados tanto ao KO sedentário quanto ao WT treinado. Não foram observadas modulações por genótipo ou exercício no conteúdo de tecido adiposo de IL-1B, IL-10 e adiponectina (**Figura 15D, E e G**).

Para determinar a produção de citocinas de macrófagos peritoneais, as células foram estimuladas ou não com LPS por 24 horas. Nossos resultados mostraram que macrófagos KO de camundongos sedentários apresentaram concentrações mais elevadas de TNF α sob condições não estimuladas e estimuladas e o exercício foi capaz de restaurar esse perfil (**Figura14 A**). Os macrófagos peritoneais de camundongos treinados aumentaram a expressão de IL-6, IL-1B, IL-10 e IL-1Ra sob estimulação com LPS. Os macrófagos KO de camundongos treinados apresentaram maior IL-1Ra em condições não estimuladas (**Figura14 F**), todavia menor IL-6 (**Figura14 B**) e maiores IL-1B e IL-10 quando estimulados (**Figura14 D e E**).

Para entender os mecanismos por trás do perfil de macrófagos peritoneais e liberação de citocinas, avaliamos alguns genes alvo inflamatórios por RT-PCR. O HIF-1 α foi reduzido em WT e KO treinado quando estimulado por LPS (**Figura 16A**). TLR-4 de macrófagos sedentários de KO aumentaram quando estimulados com LPS, no entanto o exercício foi capaz de reverter esse fenômeno (**Figura 16B**). Não houve diferença na expressão do mRNA de NF-kB (**Figura 16C**).

6.1.4 DISCUSSÃO

Investigamos se PPAR γ está envolvido na resposta metabólica, e na resposta anti-inflamatória em células mielóides de camundongos mediante programa de treinamento físico aeróbio, realizado de maneira contínua com intensidade moderada (~60% velocidade máxima). Esclarecemos que a adoção do treinamento aeróbio

moderado promoveu: 1) redução do quadro inflamatório do tecido adiposo, 2) redução na secreção de citocinas por macrófagos peritoneais, e 3) a modulação fenotípica de macrófagos independentemente da presença do PPAR- γ em células mieloides.

Melhorias na tolerância à glicose ou sensibilidade à insulina são considerados efeitos esperados do exercício físico em camundongo com dieta padrão ou rica em lipídios (GOLLISCH ET AL., 2009). Também são claras as vias pelas quais ocorrem esses benefícios, tais como uma maior translocação de transportadores de glicose para a membrana em tecidos insulino-sensíveis (HUGHES ET AL., 1993), ou na ativação de sensores energéticos capazes de promover captação de glicose em vias independentes de insulina (CHEN ET AL., 2003; BALTGALVIS ET AL., 2014). Esse resultado positivo não foi encontrado nos camundongos PPAR- γ KO. Nossos resultados mostraram que o exercício não afetou a tolerância à glicose dos camundongos PPAR- γ KO medida pelo teste de tolerância à glicose intraperitoneal, no entanto exibiram menores concentrações de glicose em repouso após o protocolo de exercício físico. Os animais KO apresentaram homeostase glicêmica como evidenciado pela ausência em alterações significativas na insulina em jejum ou no teste de resistência à insulina em comparação com o WT, portanto nossa hipótese é que devido a sua glicemia em jejum inicial ligeiramente superior aos outros grupos, a redução na ingestão calórica e exercício físico foram capazes de promover uma diminuição significativa no grupo exercitado.

Diferenças no perfil lipídico entre os genótipos também precisam ser destacadas. Camundongos PPAR- γ KO sedentários apresentaram concentrações séricas de TAG significativamente mais baixas e um conteúdo de TAG no fígado maior, apesar de não significativo, quando comparado com camundongos sedentários WT, indicando que possivelmente o TAG tem se acumulado no fígado de camundongos KO. A falta de PPAR- γ em células de *Kupffer* (macrófagos hepáticos) pode levar a uma ativação M1

ou clássica, que é mais glicolítica (GALVAN-PENA & O'NEILL, 2014). Além disso, estudos prévios observaram a sub-regulação de genes relacionados à biossíntese de ácidos graxos (ACC e FAS) e gliconeogênese (G6PC e Fbp1) (MORAN-SALVADOR ET AL., 2011) no fígado de camundongos nocaute PPAR- γ específicos para macrófagos. Consequentemente, pode ocorrer um acúmulo de TAG no fígado desses animais.

Uma importante adipocina envolvida na sensibilidade à insulina e no metabolismo da glicose é a adiponectina, produzida pelo tecido adiposo e controlada pelo PPAR- γ (ASTAPOVA & LEFF, 2012). Nosso modelo carece de PPAR- γ na linhagem de células mieloides, no entanto este fenótipo de camundongos também não aumentou as concentrações de adiponectina no soro após o protocolo de exercício. Estudos têm sugerido que a adiponectina sérica pode ser um biomarcador para ativação do PPAR in vivo (YANG ET AL., 2004), além disso, no tecido adiposo subcutâneo, o conteúdo de adiponectina parece não ser afetado pela ausência de PPAR- γ .

Outra citocina fortemente sugerida como uma das moléculas responsáveis pela resistência à insulina é o TNF- α (MAEDA ET AL., 2001). Estudos sugerem que o TNF- α tem efeitos supressores na secreção de adiponectina de forma dose-dependente (MAEDA ET AL., 2001), corroborando com os desfechos que tivemos no tecido adiposo, sem alterações na concentração de TNF- α nem diferenças de adiponectina entre os grupos sedentários de WT e KO.

Quanto à subpopulação de macrófagos, não foi observada diferença entre os macrófagos subcutâneos e peritoneais M1 e M2 dos camundongos sedentários WT e KO. No entanto, quando treinados, ambas as populações de macrófagos peritoneais aumentaram em WT, indicando que o exercício crônico parece recrutar macrófagos para a cavidade peritoneal. Uma hipótese para este recrutamento pode ser devido a um aumento na permeabilidade gastrointestinal que tem sido discutido como uma

consequência plausível da corrida (KARHU ET AL., 2017). Camundongos KO também aumentaram a população de M1 por estímulo de exercício, mas falharam em aumentar o subgrupo M2, indicando que o PPAR- γ pode desempenhar um papel importante no recrutamento e polarização de macrófagos peritoneais M2 induzida pelo exercício. A polarização dos macrófagos M2 como resultado da intervenção com exercício foi demonstrada em estudos envolvendo seres humanos (YAKEU ET AL., 2010) e camundongos (KAWANISHI ET AL., 2010), e os mecanismos envolvidos nisso estão fortemente associados ao PPAR- γ (RUFFINO ET AL., 2016).

Já no tecido adiposo subcutâneo, nenhum aumento global nas populações de macrófagos foi observado como mostrado no peritônio, mas uma prevalência de subgrupo M2 induzida pelo exercício em ambos os camundongos WT e KO. Dessa forma, sugere-se que os macrófagos residentes em tecido adiposo de camundongos magros podem não requerer o PPAR- γ para assumir o perfil de M2 em animais submetidos ao treinamento. Este tópico tem sido amplamente discutido no tecido adiposo de animais obesos (AHN & KIM, 2014), embora pudéssemos observar efeitos similares na troca fenotípica de macrófagos M2 em camundongos magros. Igualmente, esse perfil do subgrupo de macrófagos no tecido adiposo subcutâneo foi confirmado pelo conteúdo de citocinas. Não houve diferença entre os genótipos sedentários, mas as concentrações mais baixas de uma citocina pró-inflamatória clássica, TNF- α , foram observados em animais treinados em WT. O conteúdo de IL-6 foi elevado apenas em animais treinados KO e um resultado semelhante foi relatado por Van Pelt e colaboradores (2017) (VAN PELT ET AL., 2017) em ratos com excesso de peso após exercício agudo aeróbico.

De outra perspectiva, a IL-6 desempenha duplo papel: pró-inflamatória quando associada a doenças como a síndrome metabólica (BAO ET AL., 2015) e anti-inflamatória

quando induzida pelo exercício e secretada por tecido muscular (PETERSEN & PEDERSEN, 2005) e em tecido adiposo subcutâneo mesmo por longo período pós-exercício (LYNGSO ET AL., 2002). Sabe-se também que o efeito da IL-6 é lipolítico sob situação de estresse (LYNGSO ET AL., 2002). Acreditamos que nesse caso, a IL-6 possa ser liberada pelos adipócitos em resposta ao estresse pelo exercício, uma vez que os macrófagos peritoneais não apresentam nenhuma alteração nessa citocina em condições basais (não-LPS).

A MCP-1 e seu receptor CCR2 atuam como atrativos para monócitos e subsequentemente macrófagos no tecido adiposo e são considerados marcadores de inflamação (LUMENG ET AL., 2007b). Nós relatamos uma tendência no aumento de MCP-1 em animais treinados KO, mas não foi significativa ($p < 0,06$), mais uma vez sugerindo uma susceptibilidade de prejuízos dos efeitos anti-inflamatórios mediados pelo exercício em camundongos KO.

A secreção de citocinas por macrófagos peritoneais mostrou que camundongos KO sedentários apresentaram maior expressão de TNF- α sob condições de controle e estimuladas por LPS, assim o treinamento físico foi capaz de diminuir em ambos os estados, corroborando estudos realizados em homens jovens saudáveis e sedentários que observaram decréscimos em concentrações séricas de TNF- α e IFN- γ (Jahromi et al., 2014). Concentrações de IL-6 secretados por macrófagos peritoneais de animais treinados KO tiveram uma resposta positiva ao exercício sob o estímulo com LPS, no entanto, a mesma citocina teve uma resposta oposta em macrófagos do tecido adiposo.

Sugere-se que o exercício desempenha um papel imunomodulador, e não apenas uma função antiinflamatória, como constantemente descrito na literatura (PETERSEN & PEDERSEN, 2005; PELLEGRIN ET AL., 2015). Concordando com a hipótese de o exercício ser imunomodulador, os macrófagos peritoneais de animais treinados também

aumentaram as citocinas anti-inflamatórias estimuladas com LPS. Como exemplo, a secreção de IL-10 por macrófagos através da estimulação de TLR4 via LPS pode ser uma tentativa de controlar o excesso de secreção de citocinas pró-inflamatórias (IYER ET AL., 2010).

Para entender melhor os mecanismos por trás da produção de citocinas, avaliamos a expressão de mRNA de alguns genes inflamatórios e pudemos observar que o TLR-4 aumentou drasticamente em camundongos sedentários KO após a exposição ao LPS, porém recuperado com o treinamento aeróbio. O TLR4 é um receptor que reconhece estruturas microbianas e induz a respostas imunes pela via inflamatória do NF-kB (BARTON & MEDZHITOV, 2003). Nesse contexto, mais uma vez o PPAR- γ deve ser destacado pela inibição da ativação transcricional do NF-kB em macrófagos (WANG ET AL., 2015). Isso sugere que os macrófagos sem PPAR- γ reagem excessivamente ao estímulo com LPS e aumentam a inflamação, porém o treinamento físico foi capaz de reduzir essa hiperinflamação causada pela deleção do PPAR- γ .

Concluimos que o PPAR- γ é necessário para manter a resposta apropriada dos macrófagos ao estímulo inflamatório e à polarização dos macrófagos, afetando também o metabolismo lipídico de todo o corpo e o perfil de adiponectina. O treinamento físico mostrou-se como um mecanismo eficiente para restaurar a resposta imune prejudicada pela deleção do PPAR- γ em macrófagos.

6.2 CAPÍTULO 2

Subsequentemente foi induzida a obesidade via dieta hiperlipídica, portanto no capítulo 2 foram abordados os efeitos do consumo dessa dieta em ambos os genótipos.

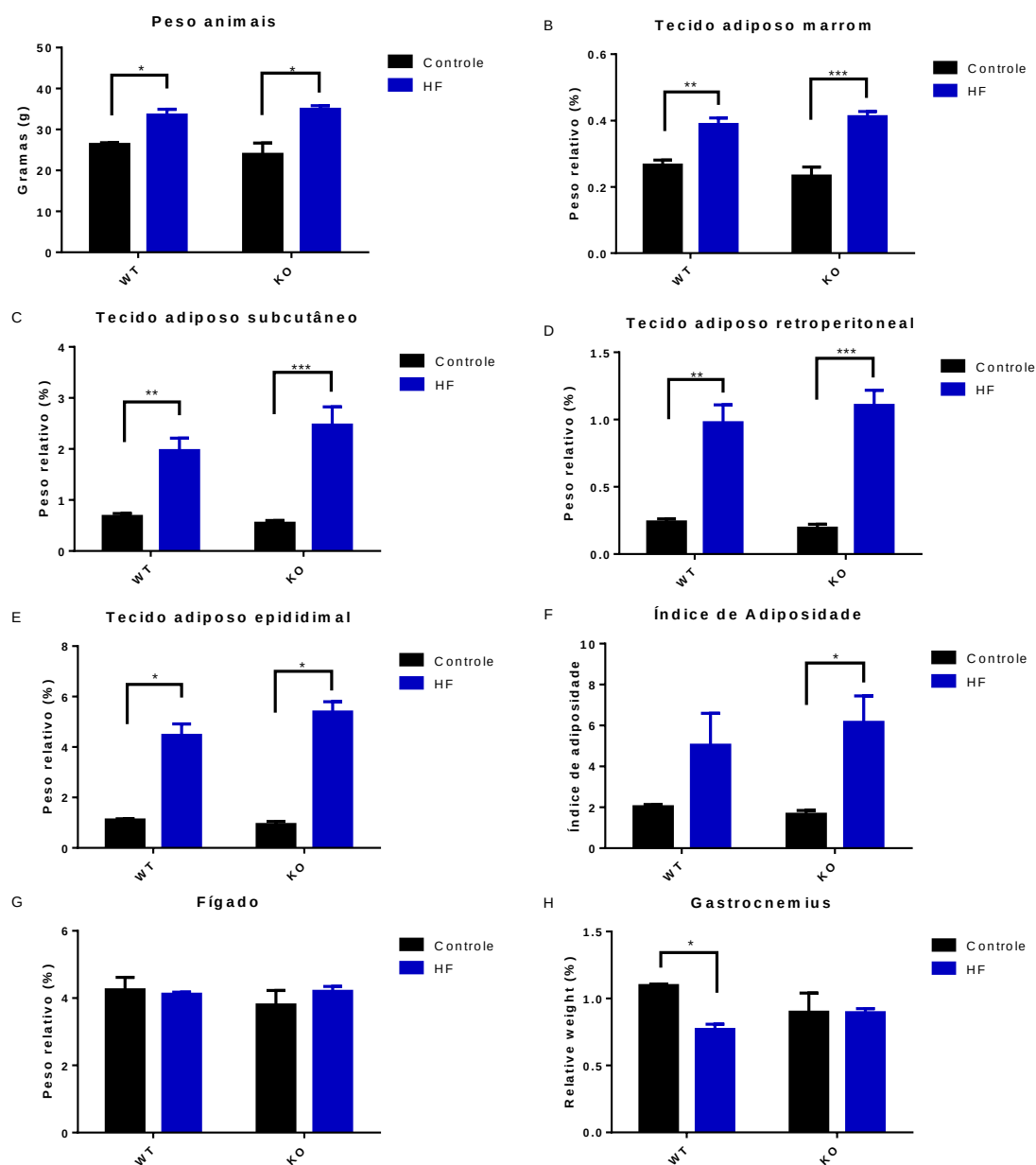


Figura 17. Variáveis de composição corporal dos camundongos WT e KO submetidos a dieta hiperlipídica. Peso corporal ao longo do protocolo (A), peso relativo dos tecidos adiposo marrom (B), subcutâneo (C), retroperitoneal (D), epididimal (E), índice de adiposidade (F), fígado (G) e musculo gastrocnemio (H). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10 por grupo). (ANOVA Two-way seguido de post test de Bonferroni) * = p < 0,05; a= diferente de WT; b= diferente de KO.

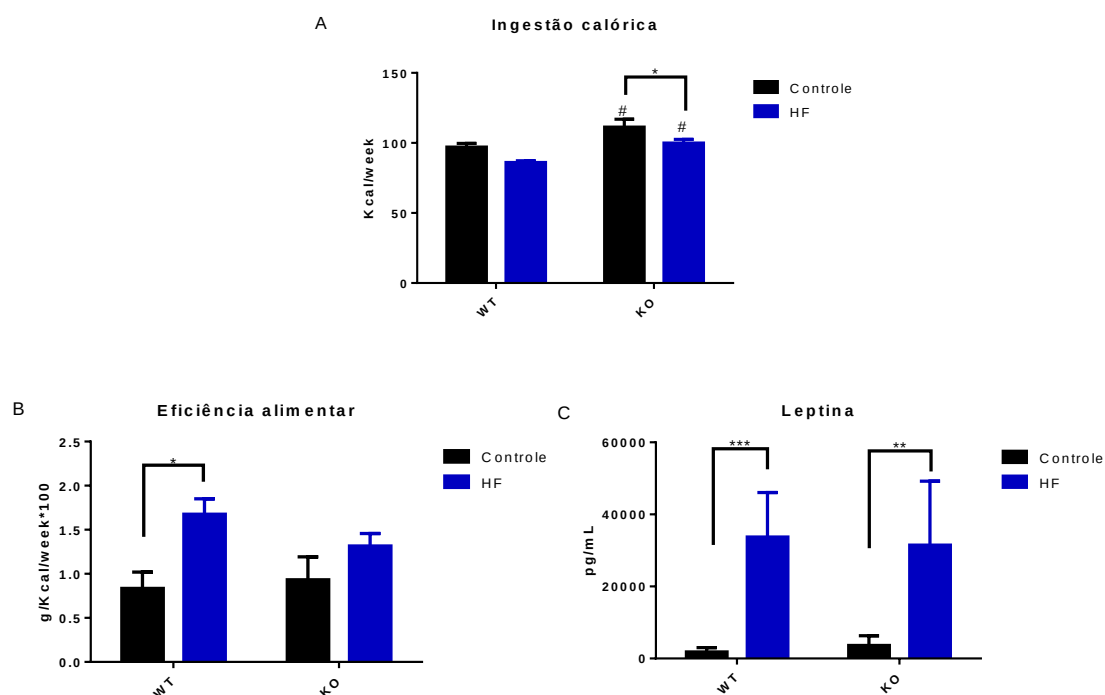


Figura 18. Efeito de deleção de PPAR- γ e da dieta hiperlipídica na ingestão calórica, eficiência energética e leptina no soro. Consumo calórico semanal (A) eficiência energética (B) e concentração de leptina no soro (C). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10/grupo). (ANOVA Two-way seguido de post test de Bonferroni) $^*=p < 0,05$; # = diferente de Control

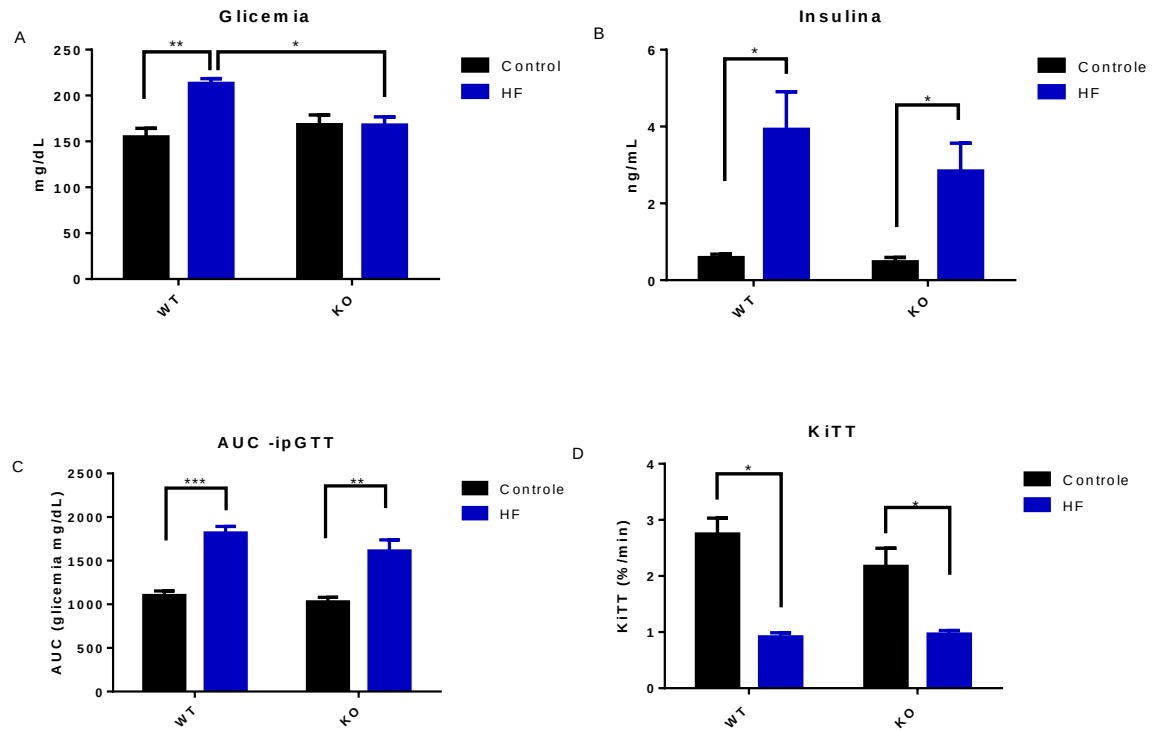


Figura 19. Efeito de deleção de PPAR- γ e da dieta hiperlipídica na homeostase glicêmica e resistência à insulina. glicemia em jejum (A) insulina em jejum (B), área sob a curva AUC (C) e constante de decaimento da glicemia (KITT) (D). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10 / grupo). (ANOVA Two-way seguido de post test de *Bonferroni*) *=p <0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001.

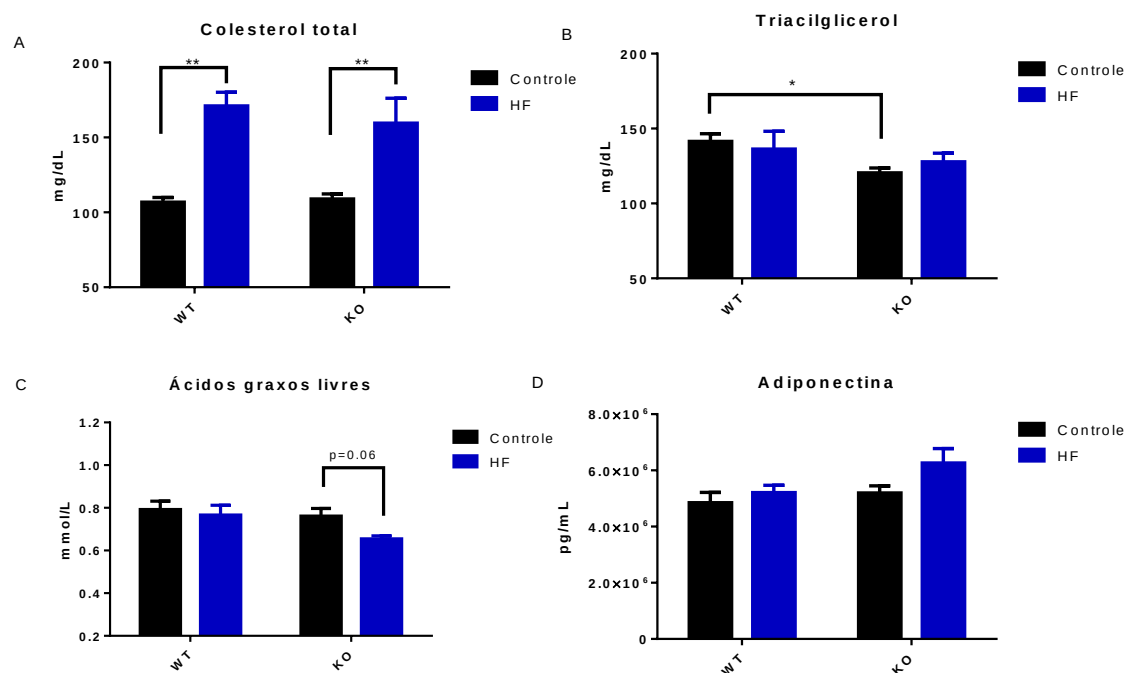


Figura 20. Efeito de supressão de PPAR- γ sobre variáveis séricas de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. As concentrações séricas de colesterol total g (A), triacilglicerol (B), ácidos graxos livres (C) e adiponectina (D). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10/grupo (ANOVA One-way seguido de *Bonferroni* post test) *=p <0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001.

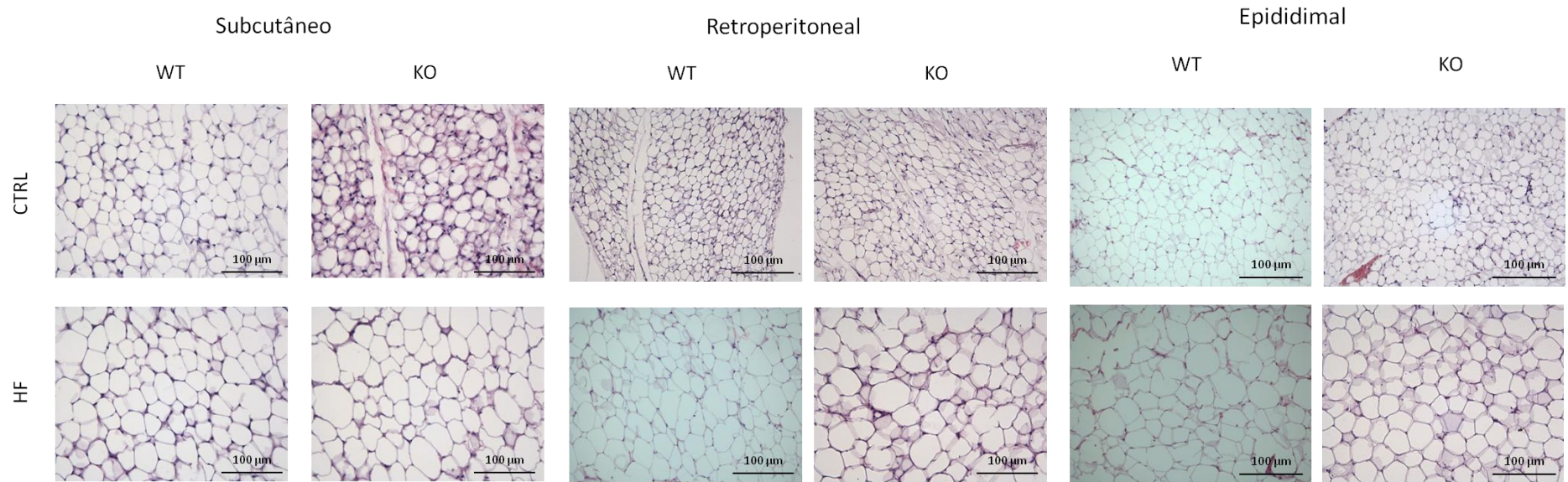


Figura 21. Imagens representativas dos cortes histológicos dos tecidos adiposos subcutâneo, epididimal e retroperitoneal de animais WT e KO controle e alimentados com dieta hiperlipídica. As lâminas foram coradas com eosina e hematoxilina e aumento de 40x.

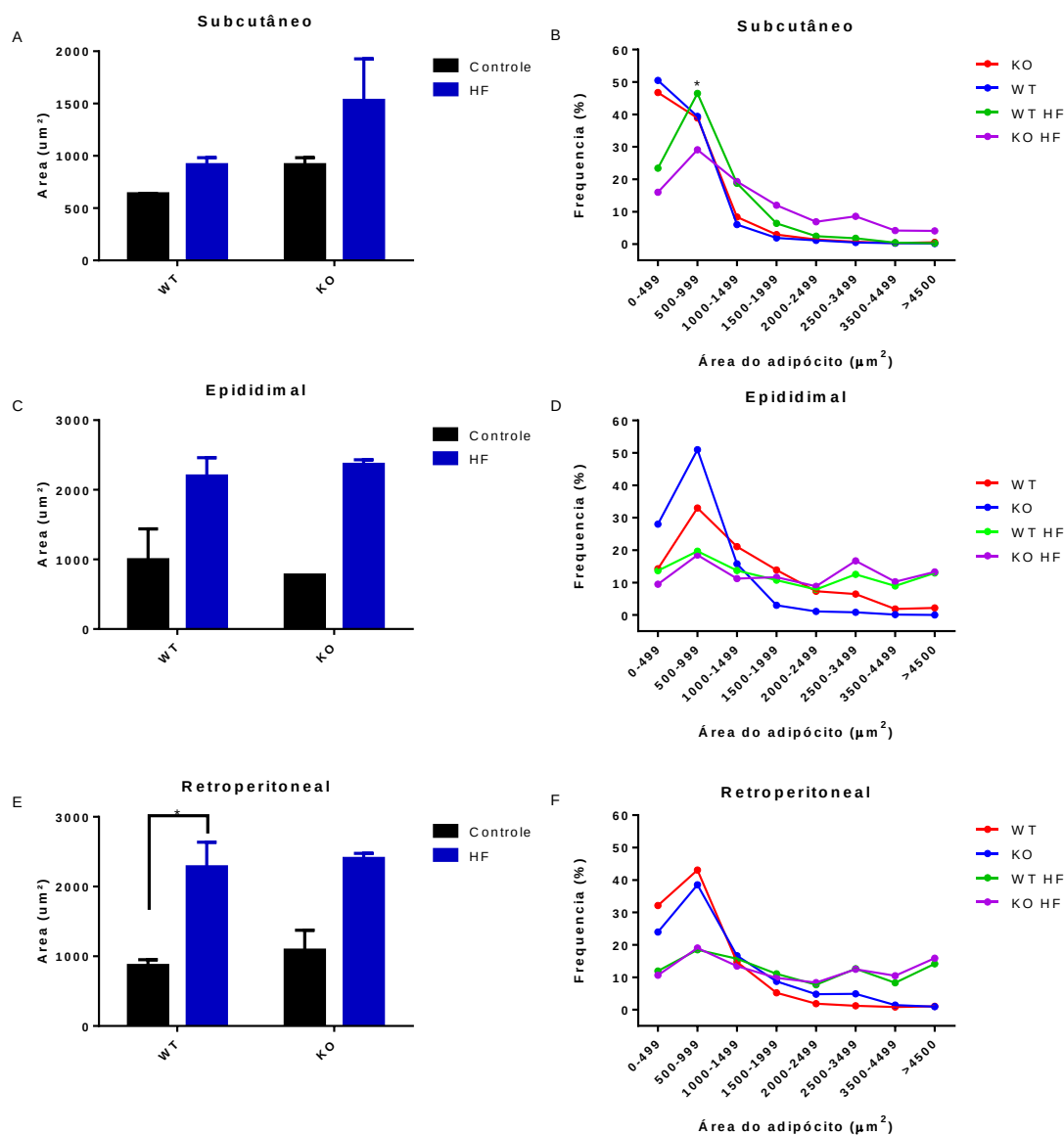


Figura 22. Morfologia dos tecidos adiposos de animais WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica. Média da área e frequência de distribuição de adipócitos por área do tecido adiposo subcutâneo (A e B), epididimal (C e D) e retroperitoneal (E e F). Os valores foram calculados a partir de imagens dos cortes histológicos por meio do programa ImagePro Plus Fiji versão 6.0. Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 3 por grupo). (ANOVA two-way seguida de *Bonferroni*) * p < 0,05 WT HF x KO HF.

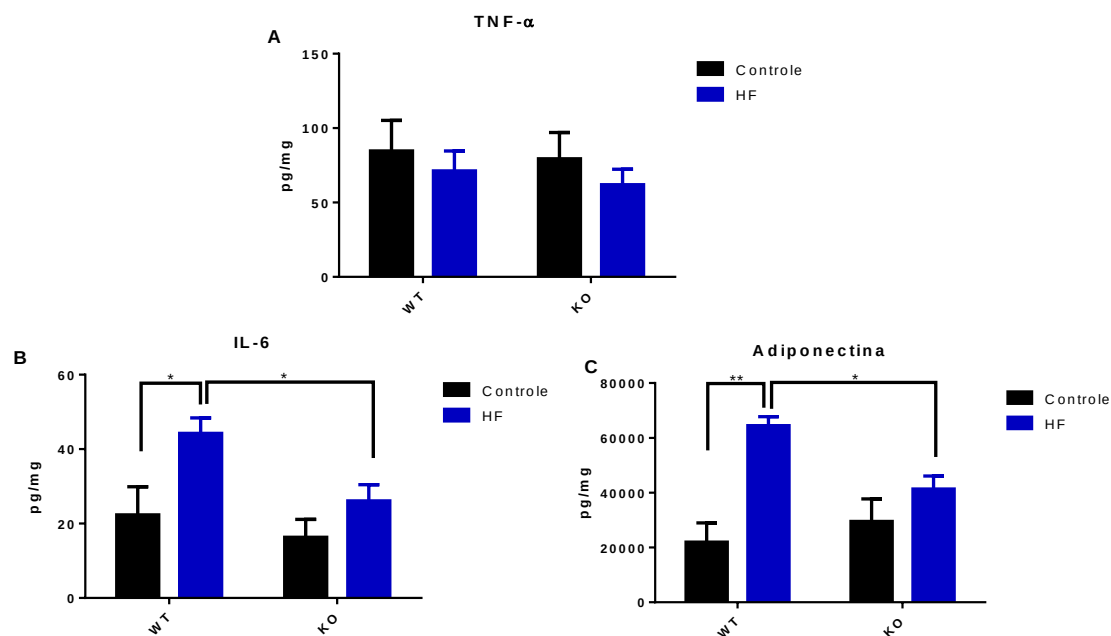


Figura 23. Conteúdo de citocinas do adipócito isolado do tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO submetidos a dieta hiperlipídica. Expressão do fator de necrose tumoral α (TNF- α) (A), interleucina-6 (IL-6) (B) e adiponectina (G). As concentrações de citocinas foram determinadas por ELISA e relativizada por proteínas totais (n =5 por grupo). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (ANOVA Two-way seguido de *Bonferroni*). * p <0,05; **p<0,01

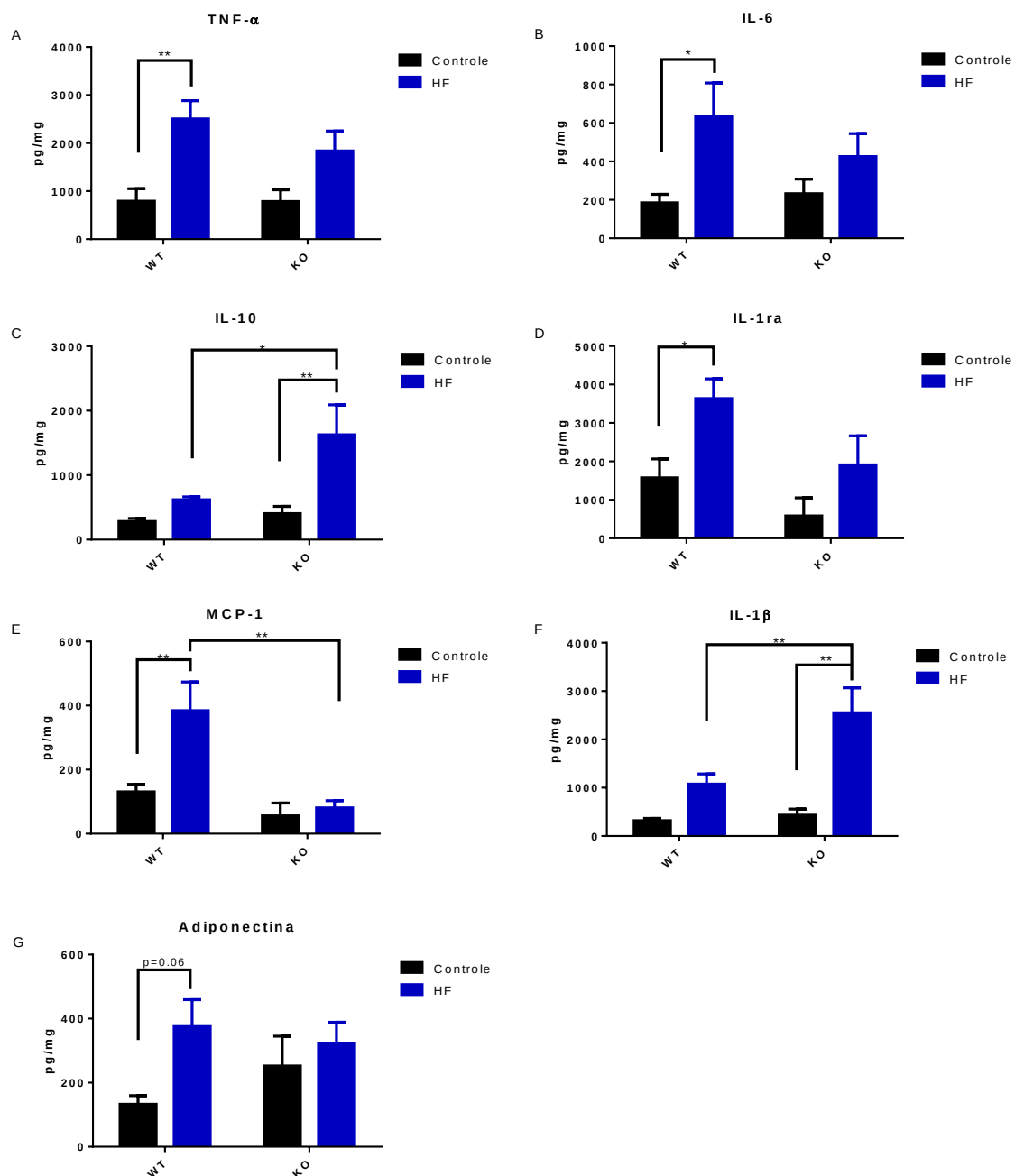


Figura 24. Conteúdo de citocinas no tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica. Conteúdo do fator de necrose tumoral α (TNF- α) (A), interleucina-6 (IL-6) (B), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (C), interleucina-1 β (IL-1 β) (D), interleucina-10 (IL-10) (E), receptor antagonista de interleucina-1 (IL-1ra) (F) e adiponectina (G). As concentrações de citocinas no tecido foram determinadas por ELISA e relativizada por proteínas totais (n =8-10 por grupo). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (ANOVA Two-way seguido de *Bonferroni*). * p < 0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

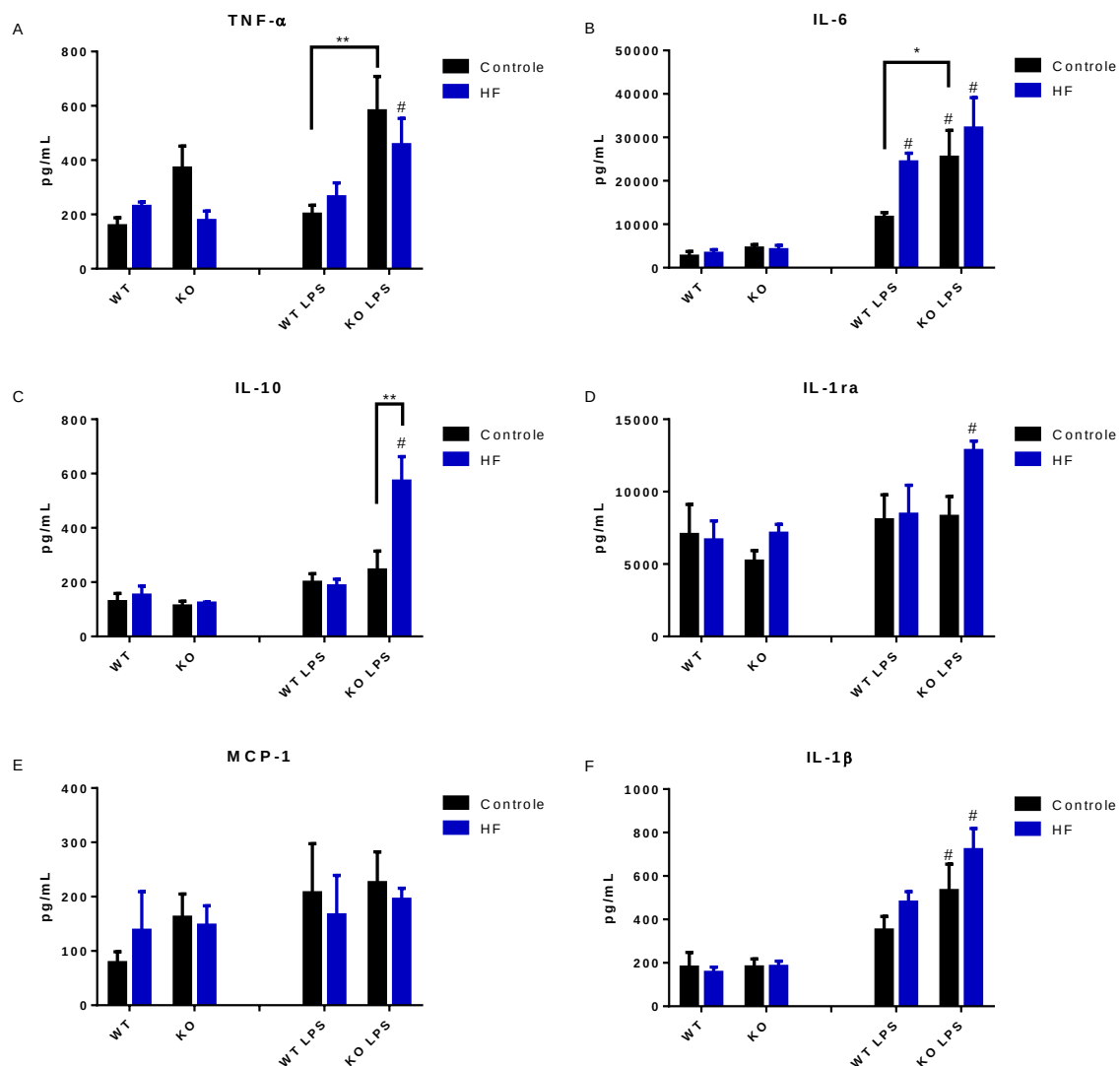


Figura 25. Produção de citocinas por cultura de macrófagos peritoneais de camundongos WT e KO control e submetidos a dieta hiperlipídica, estimulados ou não por LPS (2,5µg/mL). Fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1), interleucina-1β (IL-1β), interleucina-10 (IL-10) e receptor antagonista de interleucina-1(IL-1ra) foram determinadas por ELISA no meio de cultura (n=5-8 por grupo). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. (ANOVA Two-way seguido de Bonferroni). * p <0,05; **p<0,01; ***p<0,001; # = diferente do mesmo grupo não estimulado..

6.2.1 PPAR- γ parece interferir no remodelamento de tecido adiposo de animais submetidos à dieta hiperlipídica

Os tecidos adiposos foram analisados de acordo com as médias das áreas e a frequência de distribuição dos tamanhos dos adipócitos. De modo geral houve uma hipertrofia em decorrência da dieta hiperlipídica, porém esse aumento foi expressivo apenas em TA retroperitoneal de animais WT. (**Figura 22**). Por outro lado os depósitos que mais variaram suas hipertrofia e hiperplasia entre os genótipos foram o subcutâneo e o epididimal, sendo uma aparente maior hiperplasia na porção epididimal e hipertrofia no TA subcutâneo no grupo KO (**Figura 22**).

Por se tratar de um tecido com maior hipertrofia no grupo KO, e, pelo fato da hipertrofia apresentar uma maior relação com resistência à insulina e à inflamação, o tecido adiposo subcutâneo foi selecionado para análises posteriores.

6.2.2 Ausência de PPAR- γ no macrófago infiltrado no tecido adiposo subcutâneo apresenta diferentes respostas inflamatórias induzida pela dieta hiperlipídica.

Foi avaliada a produção de citocinas de adipócitos isolados e do tecido (total), sendo possível perceber que o TNF- α , por exemplo, produzido pelo adipócito não reflete o comportamento da citocina no tecido como um todo, sendo as células do sistema imunológicas infiltradas as grandes responsáveis pela produção desta citocina. Já as proporções encontradas em IL-6 e adiponectina são bastante semelhantes entre os ambientes analisados. (**Figura 23 e Figura 24**).

Já eram esperadas maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias resultante do aumento no tecido adiposo decorrente da dieta hiperlipídica, todavia o TA subcutâneo de animais KO não apresentou os mesmos aumentos significativos

observados em animais WT, com exceção da IL-1 β . Além disso, o TA de animais KO HF apresentou menores concentrações de MCP-1 e maiores de IL-10 (**Figura 24**).

6.2.3 Ausência de PPAR- γ no macrófago intraperitoneal exacerba resposta inflamatória induzida pelo LPS.

Macrófagos extraídos da cavidade peritoneal de animais KO obesos e cultivados sob o estímulo de LPS mostraram que a ausência do fator de transcrição PPAR- γ colaborou para o aumento na produção de citocinas. Houve aumento significativo em citocinas consideradas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , assim como em citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-1ra, o que demonstra um efeito imunomodulatório nessas células. A dieta hiperlipídica ainda foi responsável por uma maior produção de IL-10 em macrófagos KO quando comparados com macrófagos de seus pares alimentados com dieta controle (**Figura 25**).

6.2.4 DISCUSSÃO

A ideia central do capítulo foi comparar os efeitos da dieta hiperlipídica nos dois genótipos, e pudemos observar que não houve diferença no ganho de peso total, no entanto algumas características específicas precisam ser destacadas.

Foram avaliados três depósitos de tecido adiposo diferentes e apenas o TAS sofreu algum efeito no seu remodelamento com efeito da deleção do PPAR- γ . Neste caso o TAS apresentou um maior numero de células de maior tamanho, caracterizando uma maior hipertrofia comparado ao tecido dos animais WT. Sabe-se que o PPAR- γ é essencial para a adipogênese, como tem mostrado estudos com a deleção específica em fibroblastos (ROSEN ET AL., 2002), no entanto a deleção em células do sistema imune não havia sido explorada anteriormente.

É sabido que ativadores de PPAR- γ colaboram com a incorporação de ácidos graxos em células do tecido adiposo seja na hipertrofia ou na hiperplasia (DE VOS ET AL., 1996), o que talvez possa indicar uma modulação positiva de PPAR- γ no tecido adiposo no presente estudo. Contudo experimentos mais detalhados seriam necessários para compreender os mecanismos que por um remodelamento diferenciado no TAS. Na tentativa de compreender um pouco mais este comportamento, optou-se por prosseguir com a imunofenotipagem e conteúdo de citocinas neste depósito.

Apesar do fato de apresentar características que indicam uma maior suscetibilidade à inflamação, a falta do PPAR- γ abrandou o conteúdo de algumas citocinas pró-inflamatórias do TAS quando comparado ao WT. Visto que a glicemia em jejum dos animais KO HF não sofreu nenhum aumento em decorrência da dieta, uma das hipóteses para este fato seria a manutenção da homeostase glicêmica talvez por outros órgãos além do tecido adiposo, como fígado por exemplo. Em estudos prévios

foram observados que deleção do PPAR- γ no tecido adiposo poderia proteger contra os efeitos da dieta hiperlipídica na resistência à insulina e que estes efeitos seriam mediados pelo aumento na expressão gênica de PPAR- γ no fígado, uma vez que este fator de transcrição pode aumentar a expressão de GLUT2 e glicoquinase (JONES ET AL., 2005).

Quando foi analisada a secreção de citocinas sob estímulo do LPS em cultura *ex-vivo* de macrófagos notou-se exacerbada resposta inflamatória. O nosso grupo já havia observado situação semelhante em macrófagos de animais PPAR- α KO mesmo sem a indução da obesidade por dieta (SILVEIRA ET AL., 2017). Além disso, estudo com modelos *in vitro* e *in vivo* mostraram grande potencial anti-inflamatório em agonistas de PPAR- α e γ (PAUKKERI ET AL., 2013), o que instigou a nossa hipótese da importância do PPAR- γ na terapia com exercício físico.

Com base nos dados apresentados concluímos que o PPAR- γ em células mieloides pode estar relacionado à adipogênese do tecido adiposo subcutâneo, porém sua ausência não enalteceu o conteúdo de citocinas relacionadas à inflamação neste mesmo tecido. A ausência do PPAR- γ não afetou o metabolismo lipídico e o perfil de adiponectina em animais obesos, porém exacerbou a resposta inflamatória induzida pelo LPS em macrófagos peritoneais.

6.3 CAPÍTULO 3

Por fim, alguns dos grupos que receberam dieta hiperlipídica também realizaram o treinamento aeróbio moderado por oito semanas. Em ambos os grupos de animais treinados foi possível observar uma tendência à melhora na média de velocidade no segundo teste, no entanto essa tendência não foi mantida no último teste (**Figura 26**). Não houve diferença expressiva de velocidade máxima obtida nos testes entre os animais obesos mesmo com treinamento (**Figura 26**). Para confirmar este resultado foi feita uma dosagem da citrato sintase no músculo sóleo, enzima responsável pelo início do ciclo de Krebs, utilizada como marcador da capacidade aeróbia, que também não foi alterada entre os grupos (**Figura 26**).

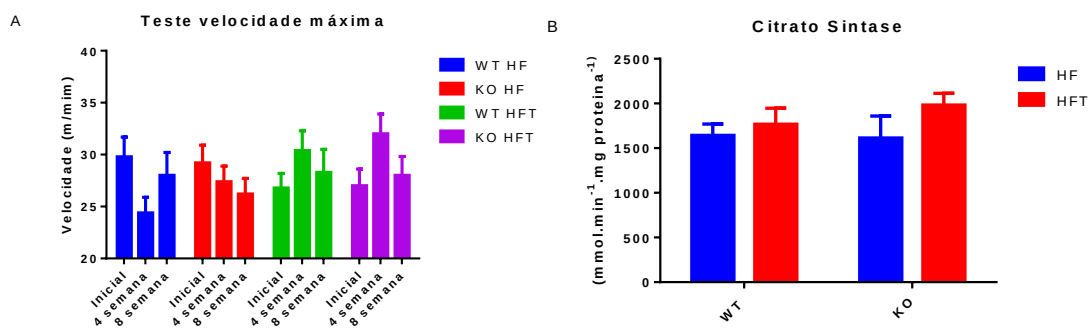


Figura 26. Teste máximo e marcadores de desempenho em animais WT e KO obesos submetidos ao treinamento aeróbio. Média de velocidade alcançada nos três testes máximo ao longo do protocolo experimental (A) e conteúdo da enzima citrato sintase no músculo sóleo (B). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média ($n = 8-10$ por grupo). (ANOVA one-way) * $p < 0,05$.

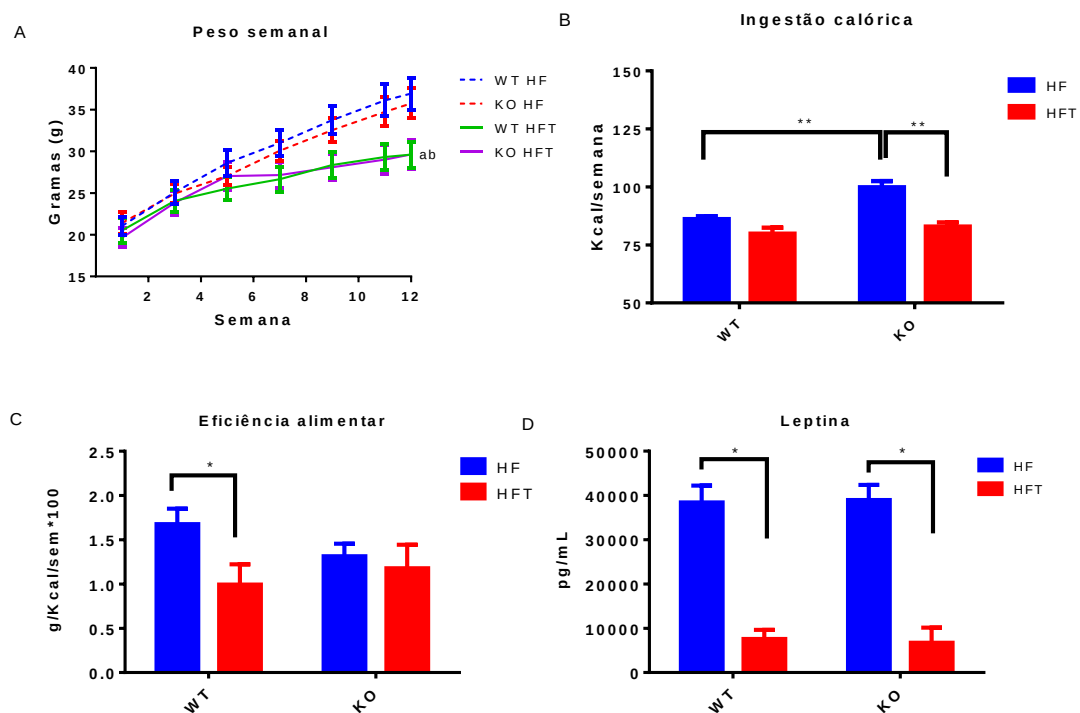


Figura 27. Efeito de deleção de PPAR- γ e do treinamento aeróbio em obesos sobre variáveis do consumo alimentar. Peso corporal semanal (A), ingestão calórica (B), eficiência alimentar (C) e concentração de leptina no soro (D). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média ($n = 8-10$ /grupo). (ANOVA Two-way seguido de post test de Bonferroni) $*=p < 0,05$; a= diferente de WT HF; b=diferente de KO HF; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

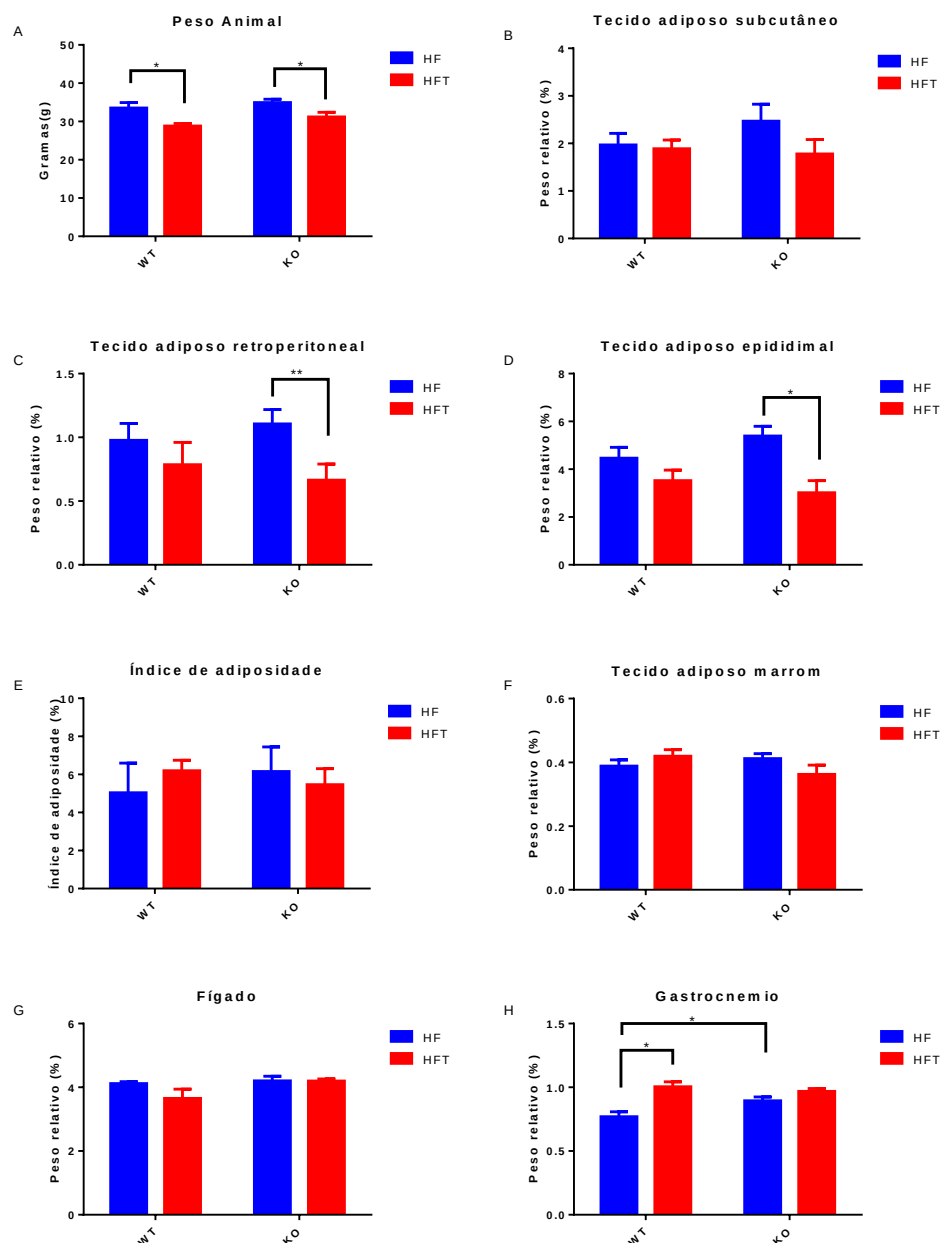


Figura 28. Variáveis de composição corporal dos camundongos WT e KO obesos submetidos ao treinamento aeróbio. Peso corporal ao final do protocolo (A), peso relativo dos tecidos adiposo subcutâneo (B), retroperitoneal (C), epididimal (D), índice de adiposidade (E), tecido adiposo marrom (F), fígado (G) e musculo gastrocnemio (H). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média ($n = 8-10$ por grupo). (ANOVA Two-way seguido de post test de Bonferroni) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

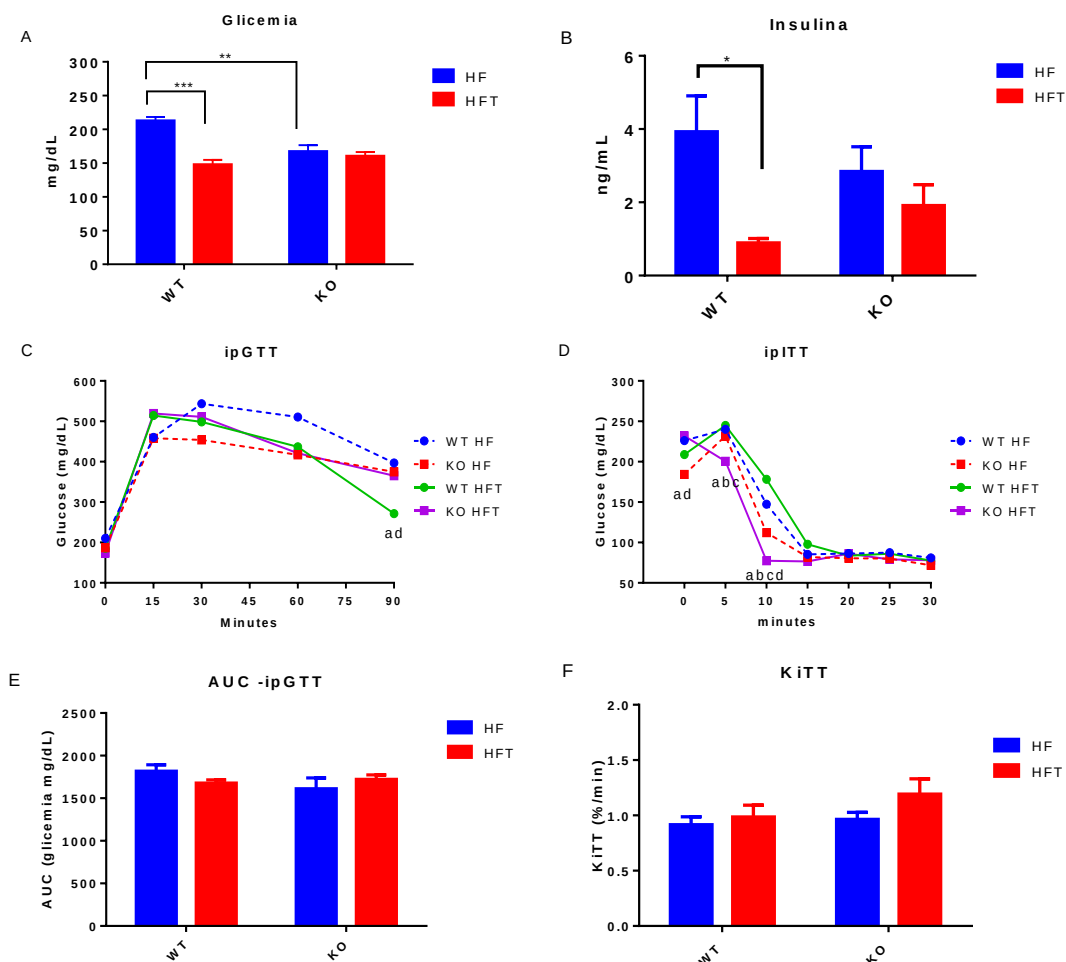


Figura 29. Metabolismo de glicose de animais WT e KO submetidos a dieta hiperlipídica e exercício aeróbio. Concentrações de glicose (A) e insulina (B) em jejum, teste de tolerância à glicose via intraperitoneal (ipGTT) (C) teste de tolerância à insulina via intraperitoneal (ipITT) (D), área sob a curva AUC do teste de tolerância a glicemia (E) e constante de decaimento da glicemia (KiTT) (F). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média ($n = 5-6$ por grupo). (ANOVA two-way seguido de *Bonferroni*) a= diferente do WT HF. b= diferente de KO HF. c= diferente de WT HFT; d= diferente do KO HFT * $p < 0,05$.

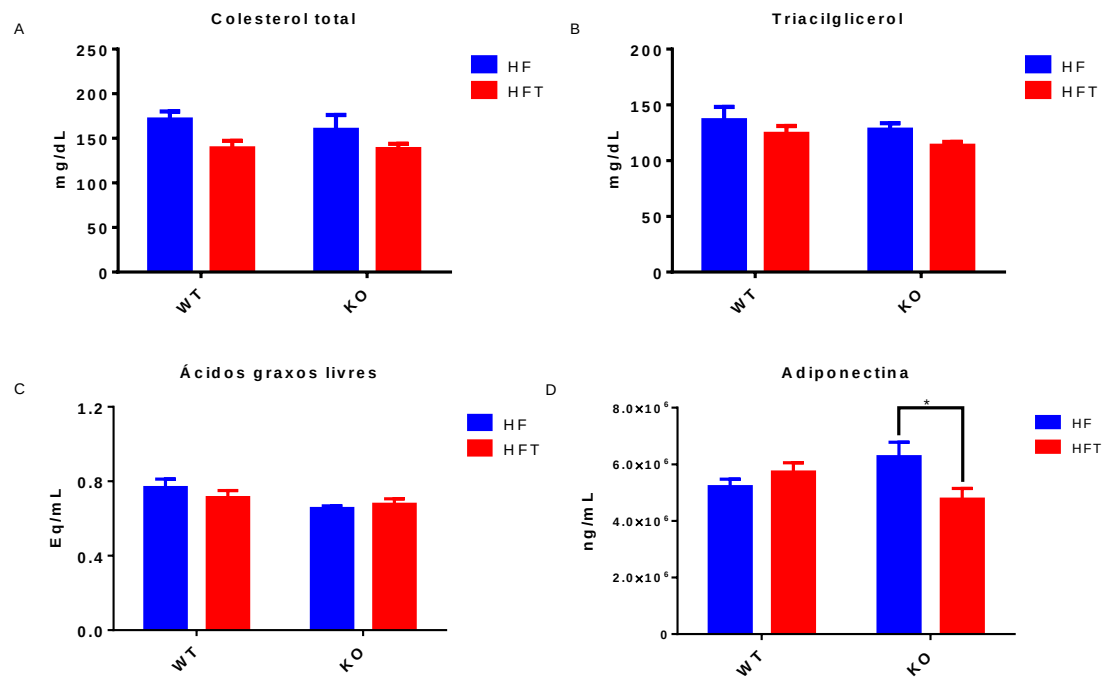


Figura 30. Efeito de deleção do PPAR- γ e exercício aeróbico sobre o perfil lipídico e adiponectina no soro de camundongos obesos. As concentrações séricas de colesterol total (A), triacilglicerol (B), ácidos graxos livres (C) e adiponectina (D). Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média (n = 8-10/grupo). (ANOVA two-way) * = p < 0,05.

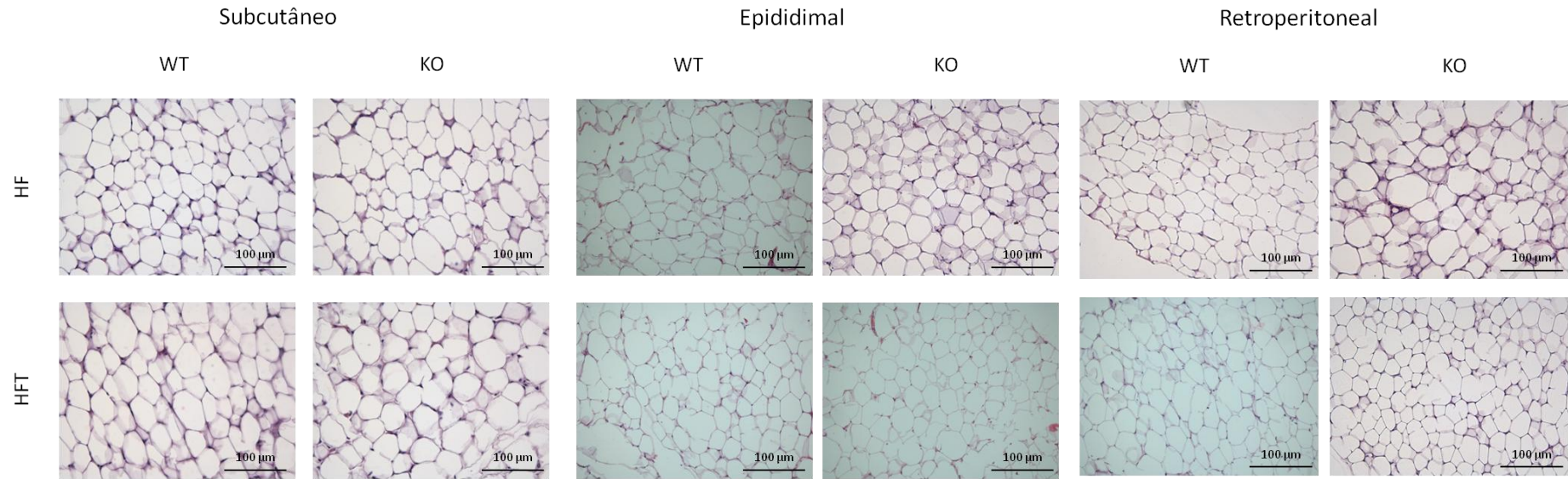


Figura 31. Imagens representativas dos cortes histológicos dos tecidos adiposos subcutâneo, epididimal e retroperitoneal corados com eosina e hematoxilina e aumento de 40x.

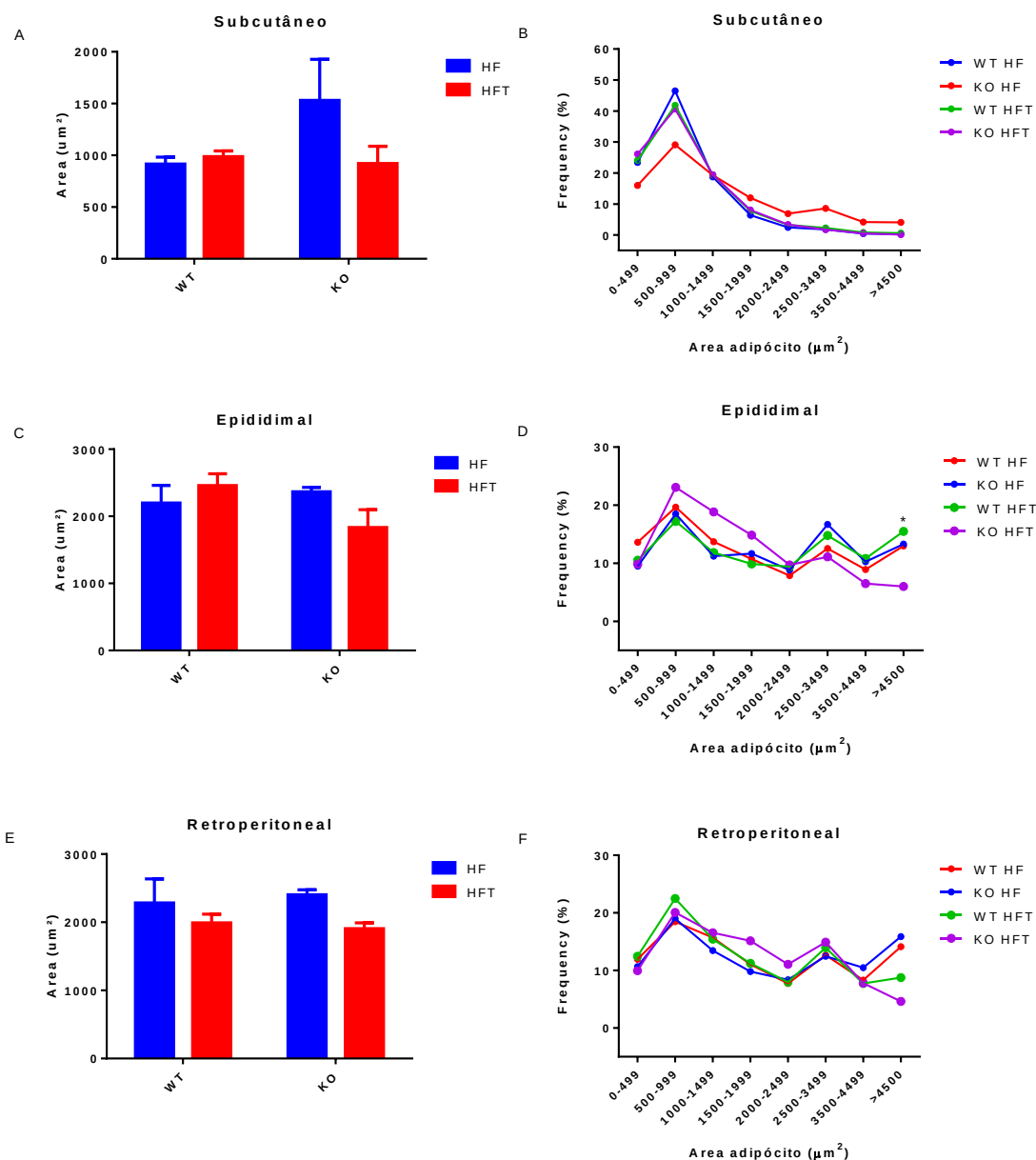


Figura 32. Morfologia dos tecidos adiposos de animais WT e KO alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento aeróbio. Média da área e frequência de distribuição de adipócitos por área do tecido adiposo subcutâneo (A e B), epididimal (C e D) e retroperitoneal (E e F). Os valores foram calculados a partir de imagens dos cortes histológicos por meio do programa ImagePro Plus Fiji versão 6.0. Todos os valores são média $\pm$ erro padrão da média ($n = 3$ por grupo). (ANOVA two-way seguida de Bonferroni) * $p < 0,05$ WT HFT x KO HFT.

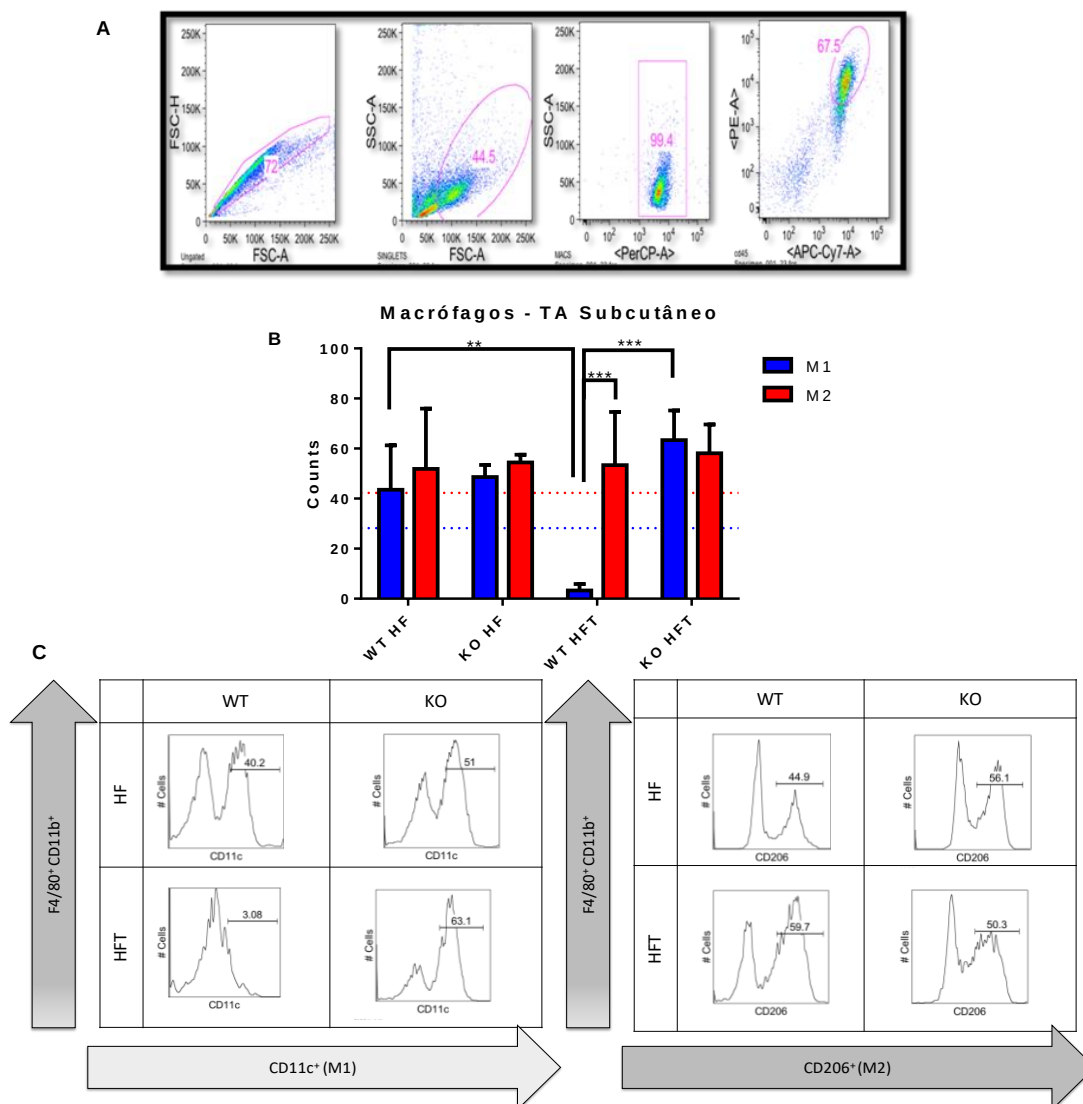


Figura 33. Caracterização fenotípica de macrófagos por citometria de fluxo. Efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício moderado sobre marcadores de polarização de macrófagos infiltrados no tecido adiposo subcutâneo em camundongos com deleção de PPAR- γ (KO) e controles (WT). Estratégia de gating usado para identificar subpopulações de macrófagos (A), quantificação dos marcadores (B) e representação em histograma dos grupos analisados (C). Após a exclusão de *doublets* e debris as células imunes foram identificadas por coloração com CD45. Uma estratégia de *gating* sequencial foi usado para identificar populações que expressam marcadores específicos (F4/80⁺ CD11b⁺), seguida pela identificação de subpopulações com sobreposição de padrões de expressão: macrófagos M1 (F4/80⁺ CD86⁺). (ANOVA Two-way seguido de Bonferroni ou t test para diferente entre M1 e M2) *p<0,05; **p,0,01; ***p<0,001.

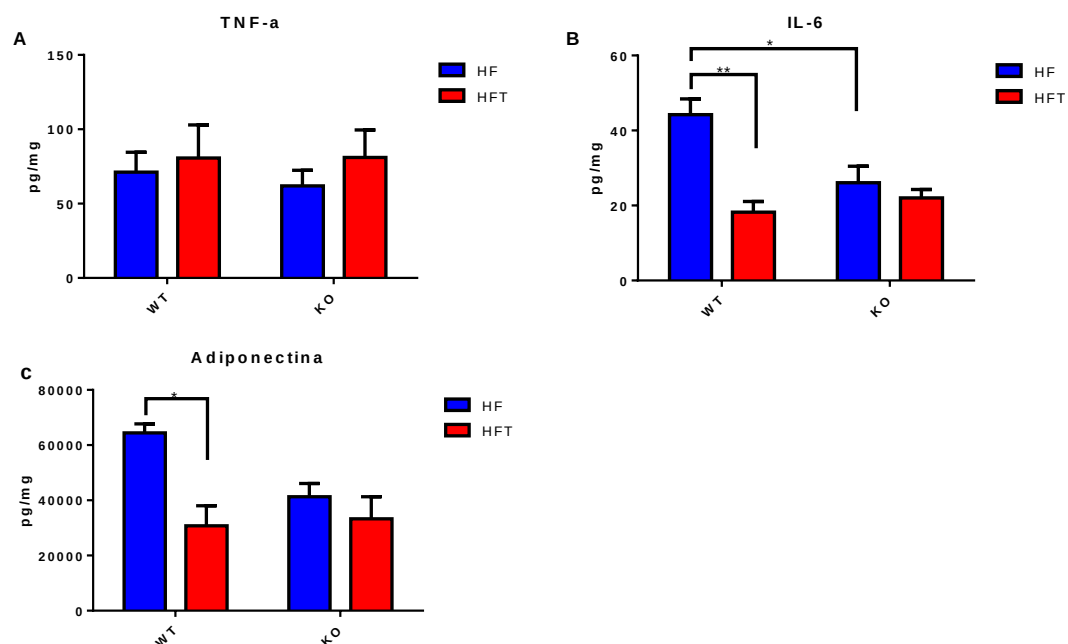


Figura 34. Conteúdo de citocinas do adipócito isolado do tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO obesos submetidos ao treinamento aeróbio. Expressão do fator de necrose tumoral α (TNF- α) (A), interleucina-6 (IL-6) (B) e adiponectina (C). As concentrações de citocinas foram determinadas por ELISA e relativizada por proteínas totais (n =5 por grupo). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (ANOVA Two-way seguido de *Bonferroni*). * p <0,05

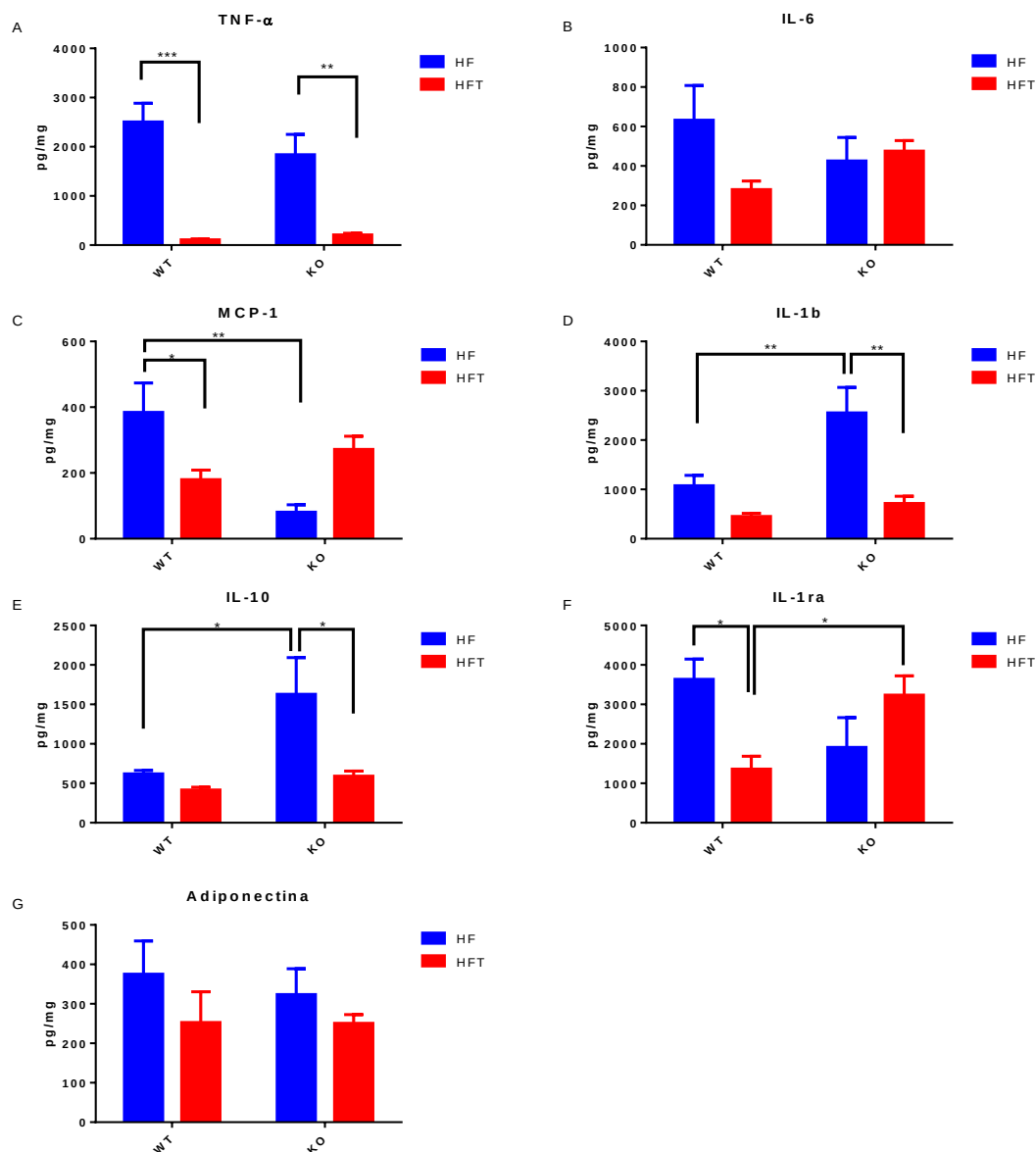


Figura 35. Conteúdo de citocinas no tecido adiposo subcutâneo de camundongos WT e KO obesos submetidos ao treinamento aeróbio. Expressão do fator de necrose tumoral - α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), receptor antagonista de interleucina-1 (IL-1ra) e interleucina-10 (IL-10). O conteúdo de citocinas no tecido foram determinadas por ELISA (n = 8-10 por grupo) e relativizada por proteínas totais. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (ANOVA two-way seguida de Bonferroni). a=diferente do WT. b=diferente de KO. C = diferente de WT HF, *= diferente do HF mesmo genótipo. p <0,05

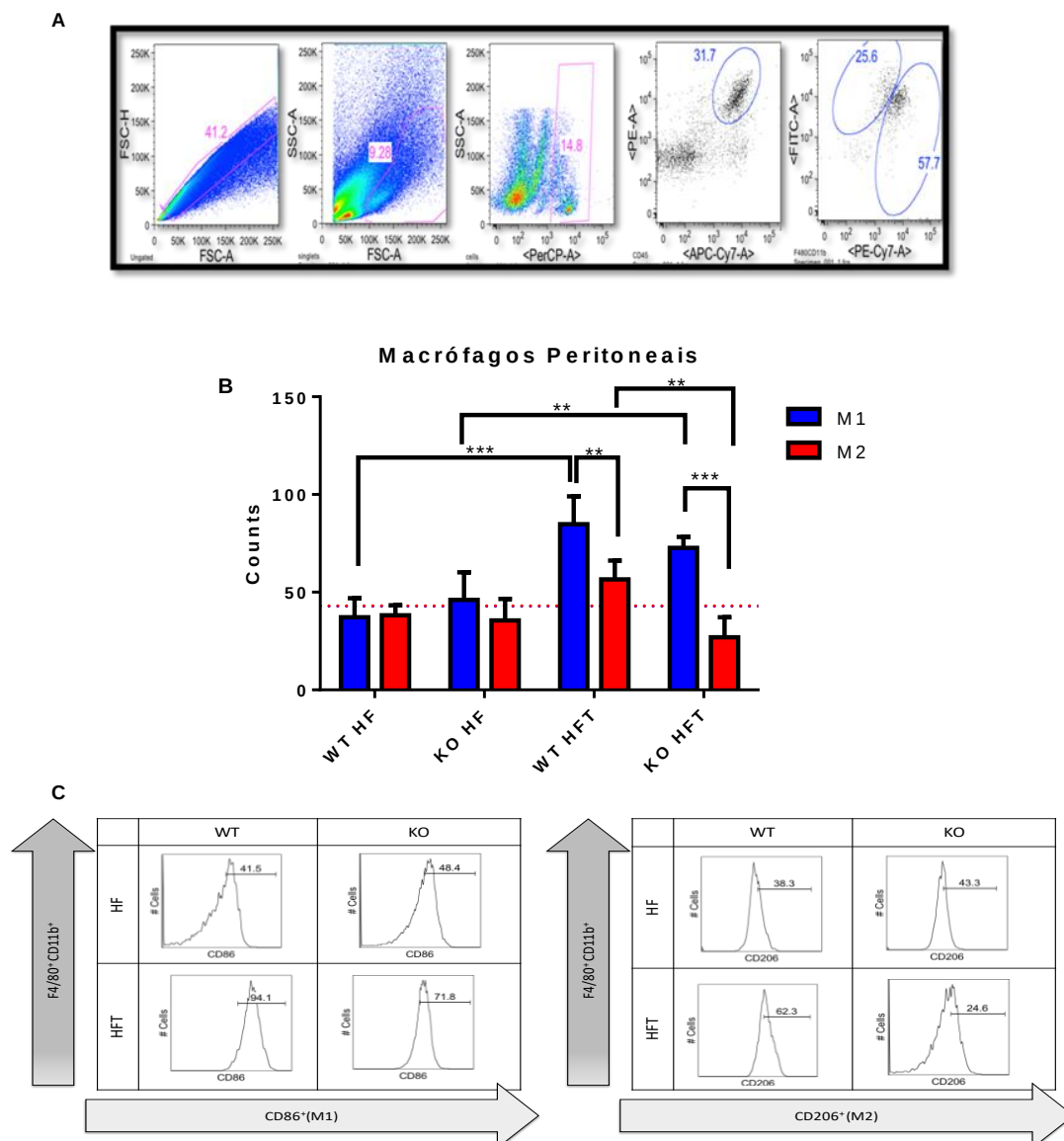


Figura 36. Caracterização fenotípica de macrófagos por citometria de fluxo. Efeitos da dieta hiperlipídica e do exercício moderado sobre marcadores de polarização de macrófagos peritoneais em camundongos com deleção de PPAR- γ (KO) e controles (WT). Estratégia de *gating* usado para identificar subpopulações de macrófagos (A), quantificação dos marcadores (B) e representação em histograma dos grupos analisados (C). Os leucócitos foram identificadas por CD45. Foi utilizada uma estratégia de marcação sequencial para identificar populações expressando marcadores específicos (F4/80+ CD11b+), seguida da identificação de subpopulações com padrões de expressão: macrófagos peritoneais M1 (CD86⁺), M2 (CD206⁺). (ANOVA Two-way seguido de Bonferroni ou *t* test para diferente entre M1 e M2) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

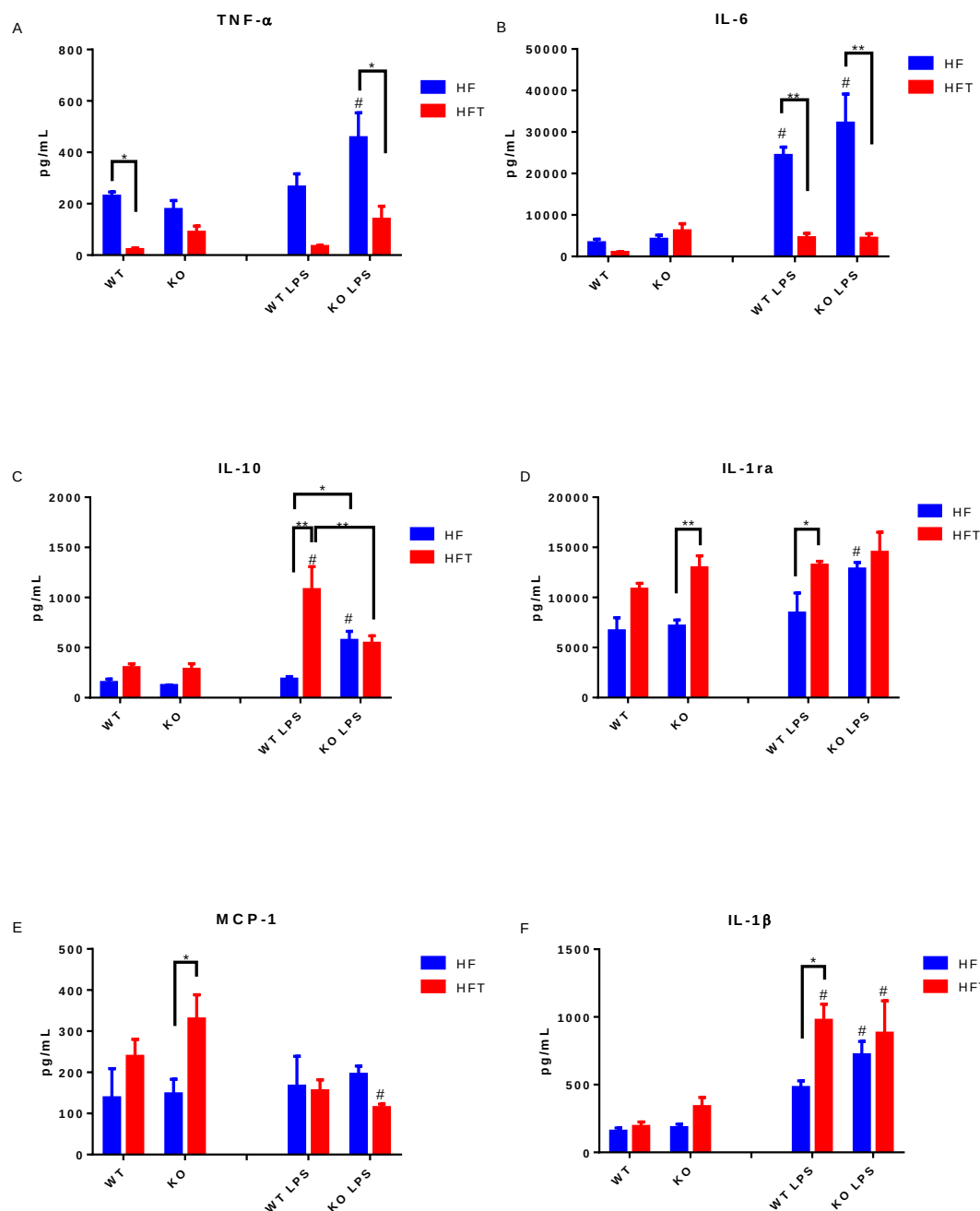


Figura 37. Produção de citocinas de macrófagos peritoneais de camundongos obesos WT e KO submetidos ao treinamento aeróbio estimulados ou não por LPS (2,5µg/mL). Fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1β (IL-1β), proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1), receptor antagonista de interleucina-1 (IL-1ra) e interleucina-10 (IL-10) foram determinadas por ELISA no meio de cultura (n=8-10 por grupo). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. (ANOVA One-way). a= diferente do WT b= diferente de KO c= diferente de WT HF *= diferente do HF mesmo genótipo. p <0,05.

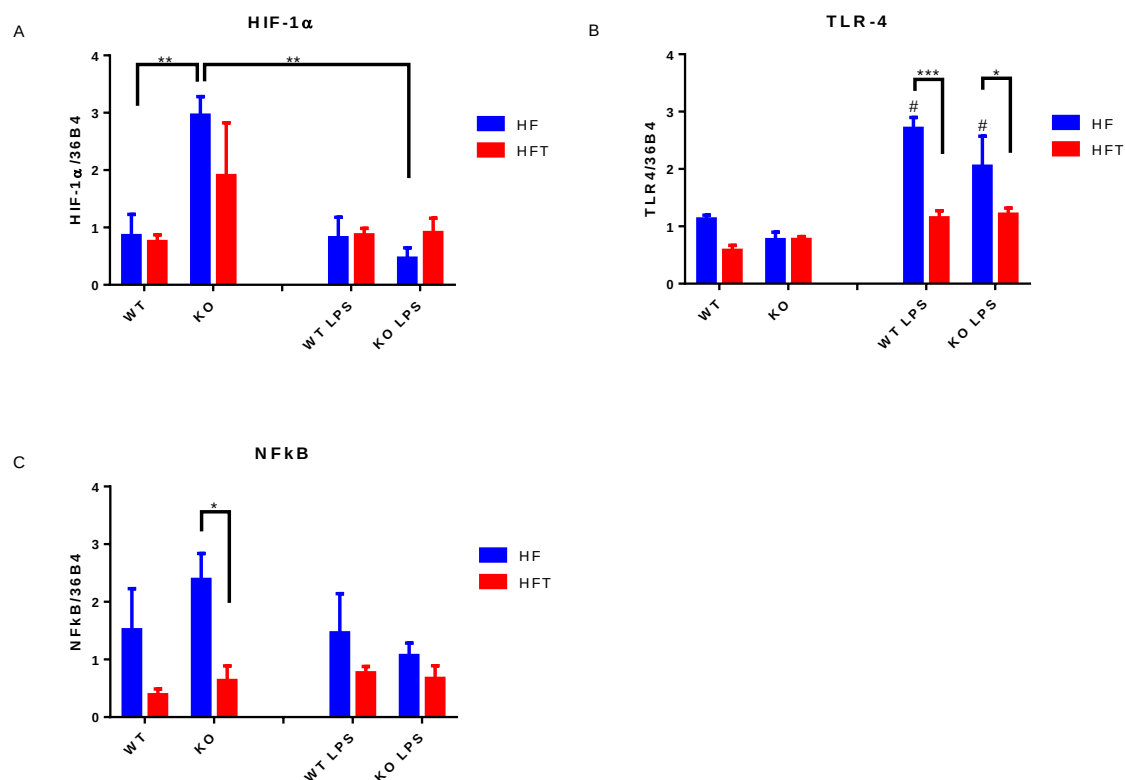


Figura 38. Expressão de genes envolvidos em vias inflamatórias em macrófagos peritoneais estimulados ou não por LPS. Fator indutor de hipóxia 1- α (HIF-1 α) (A) e receptor semelhante ao Toll-4 (TLR4) (B). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. (ANOVA Two-way seguido de Bonferroni). # = diferente do mesmo grupo não estimulado com LPS; *p <0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; #=diferente do mesmo grupo não estimulado.

6.3.1 Treino físico aeróbio evita ganho de peso exacerbado em ambos genótipos e reduz ingestão calórica apenas em animais KO

Apesar da maior ingestão de calorias em camundongos KO HF sedentários, o aumento do peso corporal ocorreu na mesma proporção da WT HF (sem significância estatística entre WT HF e KO HF). Dentre os grupos sedentários, a ingestão calórica dos animais KO HF foi superior ao WT HF, e quando treinados a ingestão foi reduzida. (**Figura 27**). Além disso, não houve alteração significativa na eficiência alimentar dos animais KO, apesar das concentrações de leptina no soro terem sido reduzidos (**Figura 27**).

Observando-se os tecidos adiposos separadamente fica evidente que animais KO tiveram redução significativa em tecidos adiposos localizados na região central (retroperitoneal e epididimal). Nenhuma alteração no peso dos tecidos adiposos de animais WT foi observada, no entanto o peso relativo do músculo gastrocnêmio aumentou com o treino nesse grupo (**Figura 28**).

6.3.2 Treinamento reduz glicemia e insulina em jejum em animais WT alimentados com dieta hiperlipídica

As concentrações de glicose e insulina no soro de animais WT HFT foram menores quando comparadas aos seus pares sedentários. No grupo KO alimentado com dieta hiperlipídica não houve um aumento considerável da glicemia como observado anteriormente (capítulo 2), sendo assim sob efeito do treino também não foi possível observar uma redução. No que diz respeito aos testes de tolerância à glicose e resistência à insulina, fica igualmente evidente que o exercício não altera as áreas sob a curva ou a constante de decaimento da glicemia após a injeção de insulina em nenhum dos genótipos (**Figura 29**).

No que diz respeito ao perfil lipídico do soro, o treinamento ou genótipo não promoveram diferenças nas variáveis analisadas (**Figura 30**), no entanto, as concentrações de adiponectina reduziram no grupo KO HFT quando parado com o seu par sedentário (**Figura 30**).

6.3.3 Treino evita hipertrofia no tecido adiposo subcutâneo de animais KO

Foi possível observar diferentes comportamentos em relação ao exercício para cada depósito de gordura, assim como parece haver uma dependência em relação à presença do PPAR- γ . O exercício foi capaz de evitar o ganho de peso exacerbado no tecido adiposo retroperitoneal de ambos os genótipos e no TAS e epididimal apenas de camundongos KO (**Figura 32**).

Apesar de o treino não ter colaborado para alteração morfológica no TAS de animais WT, os marcadores de polarização M1 dos macrófagos infiltrados foram significativamente reduzidos (**Figura 33**). Por outro lado, mesmo com redução da área do tecido dos animais KO, os macrófagos residentes mantiveram sua polarização inalterada.

Na tentativa de avaliar os efeitos do exercício também no conteúdo de citocinas foram feitas algumas dosagens em adipócitos isolados e no tecido adiposo (adipócitos + porção estromal). Verificou-se que o comportamento de IL-6 e de adiponectina foi semelhante em ambos os microambientes analisados, todavia o TNF- α parece estar sendo produzido essencialmente na porção estromal do tecido (**Figura 34**). Além disso, independente da não redução de marcadores M1 como observado no TA de animais WT, os efeitos anti-inflamatórios do exercício como a diminuição do TNF- α e IL-1 β devem ser destacados nos animais KO (**Figura 35**). Apesar de elevada IL-10 em TA de animais KO HF o exercício reverteu aos valores próximos de animais WT (**Figura 35**).

6.3.4 Exercício sustenta efeitos anti-inflamatórios em macrófagos peritoneais que apresentaram polarização M2 prejudicada pela ausência de PPAR- γ .

Marcadores de superfície de macrófagos peritoneais foram analisados na tentativa de identificar polarização M1 ou M2. O exercício aumentou principalmente marcadores M1 em animais obesos, promovendo um microambiente pro-inflamatório em ambos os genótipos, além disso, marcadores M2 estavam diminuídos em células com deleção de PPAR- γ quando comparados aos WT (**Figura 36**).

Surpreendentemente, apesar de marcadores M2 em quantidade reduzida no grupo KO HFT, este fato não prejudicou o efeito fisiológico na redução de citocinas pro-inflamatórias tais como TNF- α e IL-6 em 24h de cultura celular com estímulo de LPS (**Figura 37**). Por outro lado, a produção de IL-10 após estímulo foi menor nos macrófagos KO de animais treinados comparados aos WT. A citocina IL-1 β apresentou valores mais elevados após tratamento com LPS, sendo também acrescida com o efeito do exercício em macrófagos WT. (**Figura 37**).

Alguns genes relacionados à inflamação foram então avaliados, com o intuito de compreender se alguns deles estariam envolvidos nesse efeito imunomodulatório, mesmo com a redução na presença de marcadores M2. Observou-se que o LPS aumentou expressivamente a expressão gênica de TLR-4, e que o exercício foi capaz de impedir esse fenômeno (**Figura 38**).

Esses resultados demonstram que em macrófagos peritoneais a ausência do fator de transcrição PPAR- γ pode não ter sido um fator determinante na modulação de citocinas pró-inflamatórias.

6.3.5 DISCUSSÃO

Macrófagos são células consideradas de alta plasticidade, ou seja, podendo variar seus fenótipos e alterar seu metabolismo predominante, consequentemente produzir diferentes citocinas com características pró ou anti-inflamatórias. No capítulo em questão identificaram-se diferentes respostas de subpopulações de macrófagos (peritoneal e infiltrado no tecido adiposo) frente à obesidade e ao treinamento moderado. Como também o fator de transcrição PPAR- γ se mostrou muito importante na modulação de alterações fenotípica desses macrófagos, no entanto, em menor grau de importância no que diz respeito à modulação da produção de citocinas.

Estudos com humanos mostraram que sujeitos eutróficos parecem compensar o gasto energético extra do exercício com aumento da ingestão calórica, ao passo que os obesos não fazem uso de mecanismos compensatórios como o aumento da ingestão por possuírem um maior estoque energético (MELZER ET AL., 2005). Comportamento semelhante foi observado apenas em animais KO HFT que reduziram sua ingestão calórica apesar de também haver uma diminuição das concentrações de leptina no soro o que pode indicar que animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram resistência a leptina comum em humanos obesos (KLOK ET AL., 2007).

A redução na insulina em jejum assim como a melhora nos testes de tolerância à glicose de animais WT treinados pode estar relacionada a um aumento na captação de glicose em tecidos periféricos como o músculo esquelético por vias independentes de insulina (NIU ET AL., 2010; RICHTER & HARGREAVES, 2013), mesmo que de maneira aguda (KURAUTI ET AL., 2016). E ainda que conduzido de maneira simultânea com a dieta hiperlipídica, o treinamento melhorou o quadro de resistência à insulina nesse

grupo WT (FARIAS ET AL., 2012) devido à redução tanto na insulina quanto da glicemia em jejum.

Em modelo de animal nocaute para PPAR- γ no tecido adiposo, a dieta hiperlipídica não foi capaz de induzir a um aumento significativo no peso corporal e na resistência a insulina (JONES ET AL., 2005). Comparados aos dados do presente estudo, que utiliza animais com a deleção do mesmo gene, porém em linhagem celular mielóide foi possível perceber que a não ocorreu aumento na glicemia em jejum dos animais KO HF em comparação ao KO dieta controle (capítulo 2), assim como a insulina em jejum não diminuiu significativamente após o treinamento, apesar dos animais KO HFT terem uma redução mais acentuada no peso dos tecidos adiposos da região central (epididimal e retroperitoneal).

O exercício associado a esta diminuição de peso corporal é uma das alternativas mais relevantes para o tratamento da RI, pois além da redução do peso o exercício é capaz de aumentar a captação de glicose em tecidos periféricos como o músculo esquelético (KESHEL & COKER, 2015). Sabe-se inclusive, que a via pela qual o músculo esquelético é capaz de aumentar a captação de glicose esta na ativação de um sensor energético, a AMPK (Adenosine 5-Monophosphate-Activated Protein Kinase) (KJOBSTED ET AL., 2017) e que sua ativação em macrófagos, seja via exercício ou farmacológica (CARLING ET AL., 2012), está fortemente relacionada a um fenótipo anti-inflamatório (SAG ET AL., 2008).

O exercício também pode ser o responsável pelo aumento no acúmulo de TAG no músculo esquelético e aumento na massa total do músculo gastrocnêmio como foi observado nos animais WT HFT. Dentre as hipóteses para este aumento estão; a hipertrofia muscular propriamente dita, ou, por se tratar de um músculo com

características oxidativas e glicolíticas (fibras do tipo A e do tipo B), durante o exercício, em especial o exercício aeróbio moderado, são utilizados ácidos graxos como principal substrato energético. O acúmulo de TAG no músculo então facilitaria a utilização desse substrato uma vez que seu transporte do plasma e sua passagem pelo sarcolema poderiam ser evitados (KONOPKA & HARBER, 2014).

Ainda em relação às variáveis séricas, a adiponectina foi menor em animais KO obesos treinados. Uma revisão sistemática focada nos efeitos do exercício nas concentrações séricas de adiponectina, concluiu que em humanos, de modo geral a adiponectina era aumentada como efeito do exercício seja agudo ou crônico (SIMPSON & SINGH, 2008). Sabe-se, contudo, que a adiponectina é produzida no tecido adiposo, e que no modelo usado a deleção do PPAR- γ em células mieloides pode ter afetado sua concentração sérica, pois os adipócitos isolados do TAS de animais WT HFT reduziram seu conteúdo dessa adipocina de modo significativo. Esse fato sugere que a em animais WT essa redução existe pela diminuição da massa adiposa, mas que sistemicamente o treino mantém ou evita a queda da adiponectina e que por algum mecanismo ainda não compreendido, mas que a falta do PPAR- γ pode estar envolvido.

O PPAR- γ é um potente regulador da adipogênese e da incorporação de ácidos graxos pelo tecido adiposo (ROSEN ET AL., 2000). Não obstante, agonistas sintéticos como as tiazolidinedionas (TZDs) são utilizadas como hipoglicemiante e sensibilizador a insulina por seus efeitos na regulação positiva da lipogênese de novo, que consiste na redistribuição do TAG do músculo esquelético e do fígado para os adipócitos. Percebeu-se então a importância em caracterizar até mesmo morfológicamente os tecidos adiposos dos camundongos, afinal a relação de hipertrofia de adipócitos como um gatilho para a inflamação/infiltração de células do sistema imunológico tem sido muito abordada em estudos recentes (SCHIPPER ET AL., 2012; GOH ET AL., 2016).

De fato, foram encontradas diferenças em relação ao ganho de massa adiposa entre os genótipos e entre os locais de deposição de gordura. Por exemplo, o TAS mostrou-se com mais adipócitos de maior área em animais KO HF. Além do mais o papel dos macrófagos infiltrados no tecido adiposo é importante em diversos aspectos que vão desde o remodelamento da matriz extracelular até a diferenciação e proliferação dos adipócitos (Zaragosi, 2010). Foi observado também um aumento expressivo no número desses macrófagos em tecido adiposo de obesos, seja modelo animal (Weisberg (WEISBERG ET AL., 2003), 2003) ou humano (Harman-Boehn, 2007).

Muito se explora a respeito da suposta inflamação crônica de baixo grau causada pela obesidade, no entanto o mecanismo exato pelo qual este estado inflamatório dá início a resistência à insulina e/ou disfunções metabólicas ainda não foi totalmente elucidado. Estudos têm mostrado que os macrófagos infiltrados no tecido adiposo de sujeitos não obesos têm um perfil M2 (LAWRENCE & NATOLI, 2011), confirmado pela maior prevalência de CD206⁺ (M2) em todos os animais alimentados com dieta controle independente da presença do PPAR- γ . Uma vez que os animais foram expostos à dieta hiperlipídica houve um equilíbrio M1/M2. O exercício foi capaz de reduzir macrófagos M1 apenas em camundongos WT HFT, efeito não observado em camundongos KO HFT. Estes efeitos em animais WT estão de acordo com os achados de Kawanishi et al. (2010) que demonstraram que o aumento de CD11c pela dieta hiperlipídica foi atenuado pelo exercício crônico via inibição da infiltração dos macrófagos M1 e pela contribuição da regulação negativa de TLR4 (KAWANISHI ET AL., 2010). No contexto da obesidade ocorre diminuição da expressão do PPAR- γ e aumento na quimioatração de monócitos para este tecido (NGUYEN ET AL., 2012).

Tem sido sugerido um papel extremamente importante das citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos infiltrados no tecido adiposo, especialmente do

TNF- α e IL-1 β (LAWRENCE & NATOLI, 2011). Em concordância com o que tem sido sugerido, os nossos dados mostraram que em animais KO HF houve aumento de IL-1 β em comparação com WT HF, mas que foi revertido pelo treino aeróbio. A IL-1 β tem um papel muito importante no TA, pois está associada não apenas a resistência à insulina, mas como a secreção de citocinas pró-inflamatórias (GAO ET AL., 2014). A secreção do IL-1 β é mediada pela via do NLRP3 inflamassoma e acredita-se que o tecido adiposo seja o grande contribuidor na concentração sérica de IL-1 β (ESPOSITO ET AL., 2002). Animais KO HFT reduziram o conteúdo de IL-1 β no TAS concordando com estudos recentes que observaram que tanto exercício resistido como aeróbio podem reduzir a expressão gênica de NLRP3 e de IL-1 β , respectivamente (MARDARE ET AL., 2016).

O exercício por sua vez, se mostrou eficiente na redução das citocinas inflamatórias tais como TNF- α , MCP-1 e tendência à redução de IL-6 em WT HFT. A MCP-1 foi regulada negativamente pelo exercício apenas em animais WT, e surpreendentemente não havia excesso de MCP-1 em KO HF, porém havia de IL-1 β como citado anteriormente. Contudo, estudos têm mostrado que o aumento da MCP-1 no tecido adiposo pode estar associado à resistência à insulina, e como os animais KO HF apresentaram uma resistência mais branda, esta pode ser uma das razões pelas quais MCP-1 não foi evidenciada (WESTERBACKA ET AL., 2008).

Em divergência com a imunofenotipagem em macrófagos infiltrados no TA, a de macrófagos peritoneais não foi alterada pela ausência do PPAR- γ ou pela dieta hiperlipídica. Uma justificativa pode ser a secreção constitutiva de citocinas pró-inflamatórias observadas anteriormente em ratos Zucker obesos em resposta ao LPS (PALAVRA ET AL., 2015), possivelmente aumentado devido à dieta HF (CANI ET AL.,

2007). Além disso, os macrófagos isolados de camundongos treinados apresentaram maior quantidade de células M1 em ambos os genótipos.

Estudos prévios mostraram que mesmo com o estímulo de LPS em macrófagos com deleção do PPAR- γ , citocinas como TNF- α e IL-6 foram similares em animais WT e KO (CHAWLA ET AL., 2001), no entanto a dose de LPS utilizada foi baixa (0,1ug/mL) comparada ao presente estudo (2,5ug/mL). Chawala et al. (2001) ainda sugere que em macrófagos o PPAR- γ é necessário no efeito dos seus ligantes para o metabolismo de lipídeos, como por exemplo, regulação de seu gene alvo, CD36. No entanto, na inibição da produção de citocinas e resposta inflamatória, os efeitos podem ser independentes da capacidade de ativação do PPAR- γ (CHAWLA ET AL., 2001).

O grupo WT HFT estimulado com LPS apresentou uma resposta anti-inflamatória em consequência do exercício caracterizada por redução de TNF- α e IL-6 e aumento de IL-10 e IL-1ra. Esse aumento de IL-10 em HF pode ser explicado pela ativação de receptores TLR via LPS que induz produção de IL-10 de maneira dependente de TRIF e MyD88 (BOONSTRA ET AL., 2006). Outra possibilidade de supressão de respostas inflamatória seria por meio de um fenótipo funcional anti-inflamatório via ativação da AMPK e sua regulação negativa da degradação de I κ B e a regulação positiva de Akt. (SAG ET AL., 2008). Ainda a respeito do exercício nesse contexto de polarização, um estudo que avaliou monócitos após o treinamento físico observou que o perfil de marcadores de polarização expressos foi representativo de um subtipo específico de macrófagos M2; o subgrupo de macrófagos 'M2b', caracterizado tanto pela produção de citocinas associadas a M1 como também altas concentrações de IL-10. (MANTOVANI ET AL., 2004; HAO ET AL., 2012; KHARRAZ ET AL., 2013; RUFFINO ET AL., 2016)

Por outro lado, apesar da mesma redução em TNF- α e IL-6 ser observadas no KO HFT, nenhuma melhora em marcadores M2, como IL-10 e IL-1ra foi notada. Em humanos estudos já mostraram que exercício de baixa intensidade poderia induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos M2 via PPAR- γ /PGC-1 α/β (YAKEU ET AL., 2010), confirmando o efeito prejudicado da ação anti-inflamatória do exercício na ausência do PPAR- γ .

A produção de MCP-1 foi estimulada por dieta e exercício apenas em camundongos KO HF. Em células endoteliais, o papel do PPAR- γ na inibição da MCP-1 e IFN- γ já foi sugerido por Murao, et al. (1999) (MURAO ET AL., 1999), porém pouco se sabe sobre seus efeitos em macrófagos. Além disso, no presente estudo houve uma tendência à diminuição da MCP-1 no grupo KO HFT após estímulo de LPS em cultura. Sendo assim, uma das hipóteses para este comportamento pode ser que o estresse induzido pelo exercício tenha gerado extravazamento de LPS na circulação, resultando em autoimunização ou tolerância ao LPS (BOSENBERG ET AL., 1988), uma vez que TNF- α e IL-6 não se elevaram na presença do LPS em animais de ambos os genótipos treinados e alimentados com dieta HF.

A ativação da via TLR4/NF- κ B resulta no aumento da expressão de citocinas inflamatórias (SUGANAMI ET AL., 2007). Estudos têm mostrado que a dieta HF leva a uma inflamação local via TLR4/NF- κ B no intestino (WANG ET AL., 2013), porém estes efeitos em macrófagos peritoneais, bem como os efeitos do exercício nessa população celular não têm sido explorados. A expressão gênica inalterada de fatores relacionados à inflamação, como HIF1 α e TLR4 em macrófagos peritoneais não estimulados por LPS, pode ser sugerido como possível explicação para o não aumento em citocinas pró-inflamatórias em KO HF. Todavia o aumento na expressão gênica TLR4 em células estimuladas com LPS de modo independente do genótipo, fica evidente que o exercício

foi primordial no controle negativo do mRNA dessa proteína, além de ser uma das razões pelas quais o treinamento pode ter reduzido citocinas inflamatórias.

Por outro lado, HIF-1 α permaneceu inalterado em animais WT e elevou-se em KO HF (sem LPS), demonstrando que esse fator parece não ter efeitos sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos peritoneais. Todavia, este aumento na expressão de HIF-1 α pode estar sinalizando uma alteração no metabolismo dessas células, via um acúmulo de succinato no ciclo de *Krebs* causado pelo declínio na atividade da enzima succinato desidrogenase, gerando subsequente estabilização no fator de transcrição HIF-1 α (MILLS & O'NEILL, 2016). Cada fenótipo, M1 ou M2, possui uma assinatura metabólica diferente, ou seja, ocorre ativação e vias metabólicas distintas para cada perfil. Enquanto macrófagos M2 apresentam altas taxas de fosforilação oxidativa e oxidação de ácidos graxos, as células com características M1 tem o metabolismo glicolítico exacerbado (MILLS & O'NEILL, 2016). À vista disso, é de extrema importância que estudos e terapias que envolvem macrófagos foquem também na tentativa de reprogramação metabólica dessas células, por esta é uma maneira de consequentemente alterar seu perfil.

.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclusão 1. Com base nos dados aqui apresentados, sugere-se que a deleção do PPAR- γ em macrófagos não afetou a composição corporal ou o desempenho físico em animais alimentados com dieta controle, no entanto o treinamento não apenas proporcionou melhoras metabólicas mas também na resposta imune de animais nocaute.

Conclusão 2. A indução da obesidade gerou uma maior hipertrofia em TAS de animais KO, contudo a inflamação nesse tecido não foi exacerbada. Já macrófagos peritoneais de animais KO HF mostraram-se mais susceptíveis ao estado inflamatório após estímulo com LPS.

Conclusão 3. E por fim o treino aeróbico moderado protegeu ambos os genótipos do ganho de peso, além de reduzir a ingestão calórica e a hipertrofia do TAS de animais KO. Além disso, parecer haver diferentes respostas na polarização de macrófagos de acordo com o ambiente (peritônio ou TA) em que se encontram. O exercício ainda foi capaz de sustentar seu perfil anti-inflamatório em macrófagos peritoneais com polarização M2 prejudicada pela ausência de PPAR- γ via redução na expressão do gene TLR-4

Conclusão geral. A deleção do PPAR- γ em macrófagos de animais obesos reduziu marcadores M2 sem impedir o efeito anti-inflamatório na produção de citocinas mediado pelo exercício físico. Este efeito foi mantido possivelmente via redução na expressão de TLR-4 nos macrófagos.

8. REFERENCIAS

- 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, 2014.
- ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A..ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem J**, v. 154, n. 3, p. 689-700, 1976.
- ASTAPOVA, O..LEFF, T. Adiponectin and PPARgamma: cooperative and interdependent actions of two key regulators of metabolism. **Vitam Horm**, v. 90, p. 143-62, 2012.
- AYONRINDE, O. T.; OLYNYK, J. K.; BEILIN, L. J. et al. Gender-specific differences in adipose distribution and adipocytokines influence adolescent nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 800-9, 2011.
- BACURAU, A. V.; BELMONTE, M. A.; NAVARRO, F. et al. Effect of a high-intensity exercise training on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of walker 256 tumor bearing rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 232, n. 10, p. 1289-99, 2007.
- BACURAU, R. F.; NAVARRO, F.; BASSIT, R. A. et al. Does exercise training interfere with the effects of L-carnitine supplementation? **Nutrition**, v. 19, n. 4, p. 337-41, 2003.
- BALTGALVIS, K. A.; WHITE, K.; LI, W. et al. Exercise performance and peripheral vascular insufficiency improve with AMPK activation in high-fat diet-fed mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 8, p. H1128-45, 2014.
- BAO, P.; LIU, G..WEI, Y. Association between IL-6 and related risk factors of metabolic syndrome and cardiovascular disease in young rats. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 8, p. 13491-9, 2015.
- BARTON, G. M..MEDZHITOV, R. Toll-like receptor signaling pathways. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1524-5, 2003.
- BERGMEYER, H. U. Standardization of the reaction temperature for the determination of enzyme activity. **Z Klin Chem Klin Biochem**, v. 11, n. 1, p. 39-45, 1973.
- BISWAS, S. K..MANTOVANI, A. Orchestration of metabolism by macrophages. **Cell Metab**, v. 15, n. 4, p. 432-7, 2012.
- BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, n. 2, p. 374-8, 1989.

BOONSTRA, A.; RAJSBAUM, R.; HOLMAN, M. et al. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. **J Immunol**, v. 177, n. 11, p. 7551-8, 2006.

BOSENBERG, A. T.; BROCK-UTNE, J. G.; GAFFIN, S. L. et al. Strenuous exercise causes systemic endotoxemia. **J Appl Physiol (1985)**, v. 65, n. 1, p. 106-8, 1988.

BUTCHER, L. R.; THOMAS, A.; BACKX, K. et al. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPARgamma. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 7, p. 1263-70, 2008.

CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-72, 2007.

CANI, P. D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-81, 2008.

CARLING, D.; THORNTON, C.; WOODS, A. et al. AMP-activated protein kinase: new regulation, new roles? **Biochem J**, v. 445, n. 1, p. 11-27, 2012.

CAVALCANTE-SILVA, L. H.; GALVAO, J. G.; DA SILVA, J. S. et al. Obesity-Driven Gut Microbiota Inflammatory Pathways to Metabolic Syndrome. **Front Physiol**, v. 6, p. 341, 2015.

CECILIO, C. A.; COSTA, E. H.; SIMIONI, P. U. et al. Aging alters the production of iNOS, arginase and cytokines in murine macrophages. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 7, p. 671-81, 2011.

CHAWLA, A.; BARAK, Y.; NAGY, L. et al. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. **Nat Med**, v. 7, n. 1, p. 48-52, 2001.

CHEN, Z. P.; STEPHENS, T. J.; MURTHY, S. et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2205-12, 2003.

CHINETTI, G.; GRIGLIO, S.; ANTONUCCI, M. et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. **J Biol Chem**, v. 273, n. 40, p. 25573-80, 1998.

CHOE, S. S.; HUH, J. Y.; HWANG, I. J. et al. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 7, p. 30, 2016.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, n. 1, p. 156-9, 1987.

- CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**, v. 46, n. 11, p. 2347-55, 2005.
- COHN, Z. A. Determinants of infection in the peritoneal cavity. I. Response to and fate of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus* in the mouse. **Yale J Biol Med**, v. 35, p. 12-28, 1962.
- DA LUZ, G.; FREDERICO, M. J.; DA SILVA, S. et al. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 9, p. 2015-23, 2011.
- DE VOS, P.; LEFEBVRE, A. M.; MILLER, S. G. et al. Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **J Clin Invest**, v. 98, n. 4, p. 1004-9, 1996.
- DICKINSON, S.; HANCOCK, D. P.; PETOCZ, P. et al. High-glycemic index carbohydrate increases nuclear factor-kappaB activation in mononuclear cells of young, lean healthy subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 5, p. 1188-93, 2008.
- DOUGLAS, S. D.; MUSSON, R. A. Phagocytic defects--monocytes/macrophages. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 40, n. 1, p. 62-8, 1986.
- ESPOSITO, K.; PONTILLO, A.; CIOTOLA, M. et al. Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 8, p. 3864-6, 2002.
- FARIAS, J. M.; MAGGI, R. M.; TROMM, C. B. et al. Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adiponectin/APPL1 protein levels in mice. **Lipids Health Dis**, v. 11, p. 134, 2012.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- FUJIWARA, T.; HORIKOSHI, H. Troglitazone and related compounds: therapeutic potential beyond diabetes. **Life Sci**, v. 67, n. 20, p. 2405-16, 2000.
- GALVAN-PENA, S.; O'NEILL, L. A. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Front Immunol**, v. 5, p. 420, 2014.
- GAO, D.; MADI, M.; DING, C. et al. Interleukin-1beta mediates macrophage-induced impairment of insulin signaling in human primary adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 307, n. 3, p. E289-304, 2014.
- 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.
- GOLLISCH, K. S.; BRANDAUER, J.; JESSEN, N. et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, n. 2, p. E495-504, 2009.

GORDON, S..TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, p. 953-64, 2005.

GUILLEMIN, G. J..BREW, B. J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 3, p. 388-97, 2004.

HAO, N. B.; LU, M. H.; FAN, Y. H. et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 948098, 2012.

HIRSCH, J. G. Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff. **Bacteriol Rev**, v. 23, n. 2, p. 48-60, 1959.

HOTAMISLIGIL, G. S.; BUDAVARI, A.; MURRAY, D. et al. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. **J Clin Invest**, v. 94, n. 4, p. 1543-9, 1994.

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, 1993.

HUANG, Z.; YANG, Y.; JIANG, Y. et al. Anti-tumor immune responses of tumor-associated macrophages via toll-like receptor 4 triggered by cationic polymers. **Biomaterials**, v. 34, n. 3, p. 746-55, 2013.

HUGHES, V. A.; FIATARONE, M. A.; FIELDING, R. A. et al. Exercise increases muscle GLUT-4 levels and insulin action in subjects with impaired glucose tolerance. **Am J Physiol**, v. 264, n. 6 Pt 1, p. E855-62, 1993.

ISIDRO, R. A..APPLEYARD, C. B. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 311, n. 1, p. G59-73, 2016.

ITALIANI, P..BORASCHI, D. New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory. **Immune Netw**, v. 15, n. 4, p. 167-76, 2015.

IYER, S. S.; GHAFARI, A. A..CHENG, G. Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages. **J Immunol**, v. 185, n. 11, p. 6599-607, 2010.

JOHANSEN, K. L..PAINTER, P. Exercise in individuals with CKD. **Am J Kidney Dis**, v. 59, n. 1, p. 126-34, 2012.

JOHNSON, B. A.; WILSON, E. M.; LI, Y. et al. Ligand-induced stabilization of PPARgamma monitored by NMR spectroscopy: implications for nuclear receptor activation. **J Mol Biol**, v. 298, n. 2, p. 187-94, 2000.

JONES, J. R.; BARRICK, C.; KIM, K. A. et al. Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 17, p. 6207-12, 2005.

KAMEI, N.; TOBE, K.; SUZUKI, R. et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **J Biol Chem**, v. 281, n. 36, p. 26602-14, 2006.

KARHU, E.; FORSGARD, R. A.; ALANKO, L. et al. Exercise and gastrointestinal symptoms: running-induced changes in intestinal permeability and markers of gastrointestinal function in asymptomatic and symptomatic runners. **Eur J Appl Physiol**, v. 117, n. 12, p. 2519-2526, 2017.

KAWANISHI, N.; YANO, H.; YOKOGAWA, Y. et al. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exerc Immunol Rev**, v. 16, p. 105-18, 2010.

KESHEL, T. E.; COKER, R. H. Exercise Training and Insulin Resistance: A Current Review. **J Obes Weight Loss Ther**, v. 5, n. Suppl 5, 2015.

KHARRAZ, Y.; GUERRA, J.; MANN, C. J. et al. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 491497, 2013.

KJOBSTED, R.; MUNK-HANSEN, N.; BIRK, J. B. et al. Enhanced Muscle Insulin Sensitivity After Contraction/Exercise Is Mediated by AMPK. **Diabetes**, v. 66, n. 3, p. 598-612, 2017.

KLOK, M. D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. **Obes Rev**, v. 8, n. 1, p. 21-34, 2007.

KOLACZKOWSKA, E.; KOZIOL, A.; PLYTYCZ, B. et al. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. **Immunobiology**, v. 215, n. 6, p. 492-504, 2010.

KONOPKA, A. R.; HARBER, M. P. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 42, n. 2, p. 53-61, 2014.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-43, 2000.

KOSTELI, A.; SUGARU, E.; HAEMMERLE, G. et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 120, n. 10, p. 3466-79, 2010.

KURAUTI, M. A.; COSTA-JUNIOR, J. M.; FERREIRA, S. M. et al. Acute exercise restores insulin clearance in diet-induced obese mice. **J Endocrinol**, v. 229, n. 3, p. 221-32, 2016.

- LAWRENCE, T..NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 750-61, 2011.
- LEE, B. C..LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 446-62, 2014.
- LEE, J. Y.; SOHN, K. H.; RHEE, S. H. et al. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v. 276, n. 20, p. 16683-9, 2001.
- LEHRKE, M..LAZAR, M. A. The many faces of PPARgamma. **Cell**, v. 123, n. 6, p. 993-9, 2005.
- LINDEN, M. A.; PINCU, Y.; MARTIN, S. A. et al. Moderate exercise training provides modest protection against adipose tissue inflammatory gene expression in response to high-fat feeding. **Physiol Rep**, v. 2, n. 7, 2014.
- LIRA, F. S.; CARNEVALI, L. C., JR.; ZANCHI, N. E. et al. Exercise intensity modulation of hepatic lipid metabolism. **J Nutr Metab**, v. 2012, p. 809576, 2012.
- LIVAK, K. J..SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LUMENG, C. N. Innate immune activation in obesity. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 1, p. 12-29, 2013.
- LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L..SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175-84, 2007a.
- LUMENG, C. N.; DEYOUNG, S. M.; BODZIN, J. L. et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 16-23, 2007b.
- LUMENG, C. N..SALTIEL, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2111-7, 2011.
- LYNGSO, D.; SIMONSEN, L..BULOW, J. Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: the effect of exercise. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 1, p. 373-8, 2002.
- MAEDA, N.; TAKAHASHI, M.; FUNAHASHI, T. et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 2094-9, 2001.
- MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, 2004.

MARDARE, C.; KRUGER, K.; LIEBISCH, G. et al. Endurance and Resistance Training Affect High Fat Diet-Induced Increase of Ceramides, Inflammasome Expression, and Systemic Inflammation in Mice. **J Diabetes Res**, v. 2016, p. 4536470, 2016.

MARTINEZ, F. O..GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, v. 6, p. 13, 2014.

MELZER, K.; KAYSER, B.; SARIS, W. H. et al. Effects of physical activity on food intake. **Clin Nutr**, v. 24, n. 6, p. 885-95, 2005.

MILLS, E. L..O'NEILL, L. A. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. **Eur J Immunol**, v. 46, n. 1, p. 13-21, 2016.

MORAN-SALVADOR, E.; LOPEZ-PARRA, M.; GARCIA-ALONSO, V. et al. Role for PPARgamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. **FASEB J**, v. 25, n. 8, p. 2538-50, 2011.

MUNDER, M.; MALLO, M.; EICHMANN, K. et al. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. **J Exp Med**, v. 187, n. 12, p. 2103-8, 1998.

MURAO, K.; IMACHI, H.; MOMOI, A. et al. Thiazolidinedione inhibits the production of monocyte chemoattractant protein-1 in cytokine-treated human vascular endothelial cells. **FEBS Lett**, v. 454, n. 1-2, p. 27-30, 1999.

NGUYEN, M. T.; CHEN, A.; LU, W. J. et al. Regulation of chemokine and chemokine receptor expression by PPARgamma in adipocytes and macrophages. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34976, 2012.

NIEMAN, D. C..NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L. The immune response to exercise. *Seminars in hematology*, 1994. p.166-179.

NIU, Y.; YUAN, H..FU, L. Aerobic exercise's reversal of insulin resistance by activating AMPKalpha-ACC-CPT1 signaling in the skeletal muscle of C57BL/6 mice. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 20, n. 5, p. 370-80, 2010.

ODEGAARD, J. I..CHAWLA, A. Alternative macrophage activation and metabolism. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 275-97, 2011.

ODEGAARD, J. I.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; GOFORTH, M. H. et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116-20, 2007.

PALAVRA, F.; REIS, F.; MARADO, D. et al. **Biomarkers of Cardiometabolic Risk, Inflammation and Disease**: Springer International Publishing Switzerland 2015.

PAUKKERI, E. L.; LEPPANEN, T.; LINDHOLM, M. et al. Anti-inflammatory properties of a dual PPARgamma/alpha agonist muraglitazar in in vitro and in vivo models. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 2, p. R51, 2013.

PELLEGRIN, M.; AUBERT, J. F.; BOUZOURENE, K. et al. Voluntary Exercise Stabilizes Established Angiotensin II-Dependent Atherosclerosis in Mice through Systemic Anti-Inflammatory Effects. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0143536, 2015.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154-62, 2005.

PLUTZKY, J. The potential role of peroxisome proliferator-activated receptors on inflammation in type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. **Am J Cardiol**, v. 92, n. 4A, p. 34J-41J, 2003.

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

RIGAMONTI, E.; FONTAINE, C.; LEFEBVRE, B. et al. Induction of CXCR2 receptor by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 5, p. 932-9, 2008.

RINGSEIS, R.; EDER, K.; MOOREN, F. C. et al. Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 21, p. 58-68, 2015.

RIPPE, B. A three-pore model of peritoneal transport. **Perit Dial Int**, v. 13 Suppl 2, p. S35-8, 1993.

ROSEN, E. D.; HSU, C. H.; WANG, X. et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. **Genes Dev**, v. 16, n. 1, p. 22-6, 2002.

ROSEN, E. D.; WALKEY, C. J.; PUIGSERVER, P. et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes Dev**, v. 14, n. 11, p. 1293-307, 2000.

RUFFINO, J. S.; DAVIES, N. A.; MORRIS, K. et al. Moderate-intensity exercise alters markers of alternative activation in circulating monocytes in females: a putative role for PPARgamma. **Eur J Appl Physiol**, v. 116, n. 9, p. 1671-82, 2016.

SAG, D.; CARLING, D.; STOUT, R. D. et al. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8633-41, 2008.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 12, p. 7265-70, 2003.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nat Methods**, v. 9, n. 7, p. 676-82, 2012.

SCHIPPER, H. S.; PRAKKEN, B.; KALKHOVEN, E. et al. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 8, p. 407-15, 2012.

SILVEIRA, L. S.; PIMENTEL, G. D.; SOUZA, C. O. et al. Effect of an acute moderate-exercise session on metabolic and inflammatory profile of PPAR-alpha knockout mice. **Cell Biochem Funct**, v. 35, n. 8, p. 510-517, 2017.

SIMPSON, K. A.; SINGH, M. A. Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 2, p. 241-56, 2008.

SPIEGELMAN, B. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF alpha. **Cell**, v. 73, n. 4, p. 625-7, 1993.

STIENSTRA, R.; DUVAL, C.; MULLER, M. et al. PPARs, Obesity, and Inflammation. **PPAR Res**, v. 2007, p. 95974, 2007.

SUGANAMI, T.; TANIMOTO-KOYAMA, K.; NISHIDA, J. et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 1, p. 84-91, 2007.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **J Clin Invest**, v. 121, n. 6, p. 2094-101, 2011.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, n. 1, p. 3-9, 2004.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 4, p. 625-35, 2001.

THOMAS, A. W.; DAVIES, N. A.; MOIR, H. et al. Exercise-associated generation of PPARgamma ligands activates PPARgamma signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. **J Appl Physiol (1985)**, v. 112, n. 5, p. 806-15, 2012.

TRAYHURN, P.; WANG, B.; WOOD, I. S. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? **Br J Nutr**, v. 100, n. 2, p. 227-35, 2008.

TURCHYN, L. R.; BAGINSKI, T. J.; RENKIEWICZ, R. R. et al. Phenotypic and functional analysis of murine resident and induced peritoneal macrophages. **Comp Med**, v. 57, n. 6, p. 574-80, 2007.

ULLUM, H.; HAAHR, P. M.; DIAMANT, M. et al. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. **J Appl Physiol (1985)**, v. 77, n. 1, p. 93-7, 1994.

VAN PELT, D. W.; GUTH, L. M.; HOROWITZ, J. F. Aerobic exercise elevates markers of angiogenesis and macrophage IL-6 gene expression in the subcutaneous adipose tissue of overweight-to-obese adults. **J Appl Physiol (1985)**, v. 123, n. 5, p. 1150-1159, 2017.

VAN WIJCK, K.; LENAERTS, K.; GROOTJANS, J. et al. Physiology and pathophysiology of splanchnic hypoperfusion and intestinal injury during exercise: strategies for evaluation and prevention. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 303, n. 2, p. G155-68, 2012.

VANDANMAGSAR, B.; YOUM, Y. H.; RAVUSSIN, A. et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nat Med**, v. 17, n. 2, p. 179-88, 2011.

VIGITEL, M. D. S. B. **Vigitel Brasil 2017: saúde suplementar: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2017**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde.: 140 p. 2017.

WALSH, N. P.; GLEESON, M.; PYNE, D. B. et al. Position statement. Part two: Maintaining immune health. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 64-103, 2011.

WANG, F.; MULLICAN, S. E.; DISPIRITO, J. R. et al. Lipoatrophy and severe metabolic disturbance in mice with fat-specific deletion of PPARgamma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 46, p. 18656-61, 2013.

WANG, L.; CHEN, K.; LIU, K. et al. DHA inhibited AGEs-induced retinal microglia activation via suppression of the PPARgamma/NFkappaB pathway and reduction of signal transducers in the AGEs/RAGE axis recruitment into lipid rafts. **Neurochem Res**, v. 40, n. 4, p. 713-22, 2015.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, 2003.

WESTERBACKA, J.; CORNER, A.; KOLAK, M. et al. Insulin regulation of MCP-1 in human adipose tissue of obese and lean women. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 5, p. E841-5, 2008.

WHO. Reducing cardiovascular disease risk with exercise. **J Cardiovasc Nurs**, v. 30, n. 1, p. 3-4, 2015.

WOODS, S. P.; MORGAN, E. E.; MARQUIE-BECK, J. et al. Markers of macrophage activation and axonal injury are associated with prospective memory in HIV-1 disease. **Cogn Behav Neurol**, v. 19, n. 4, p. 217-21, 2006.

YAKEU, G.; BUTCHER, L.; ISA, S. et al. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPARgamma and Th2 cytokines. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 2, p. 668-73, 2010.

YANG, B.; BROWN, K. K.; CHEN, L. et al. Serum adiponectin as a biomarker for in vivo PPARgamma activation and PPARgamma agonist-induced efficacy on insulin sensitization/lipid lowering in rats. **BMC Pharmacol**, v. 4, p. 23, 2004.

YUDKIN, J. S. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. **Horm Metab Res**, v. 39, n. 10, p. 707-9, 2007.

ZHANG, X.; GONCALVES, R..MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 14 Unit 14.1, p. 1-18, 2008.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, 1994.

9. ANEXOS

9.1. Comitê de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **112** nas fls. **11** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **José César Rosa Neto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeitos do exercício físico nas alterações imuno-metabólicas hepáticas induzidas por dieta hiperlipídica em camundongos PPAR-₊*" do qual participam o(s) aluno(s) **Camila Oliveira de Souza**, **Alexandre Abílio de Souza Teixeira**, **Edson Alves de Lima Junior**, **Helena Angélica Pereira Batatinha**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **10.10.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 11 de outubro de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
---	--

Decl. CEUA.061/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 112/13/CEUA, datado de 10.10.13. e por solicitação da Prof. Dr. **José César Rosa Neto**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão de **Loreana Sanches Silveira** ao Protocolo de Pesquisa " *Efeitos do exercício físico nas alterações imuno-metabólicas hepáticas induzidas por dieta hiperlipídica em camundongos PPAR- α* " uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 04 de agosto de 2014.



Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP

9.2. Artigo Publicado na Cell Biochemistry and Function

Received: 31 January 2017 | Revised: 23 June 2017 | Accepted: 17 September 2017

DOI: 10.1002/cbf.3308

WILEY CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION

RESEARCH ARTICLE

Effect of an acute moderate-exercise session on metabolic and inflammatory profile of PPAR- α knockout mice

Loreana S. Silveira¹  | Gustavo D. Pimentel² | Camila O. Souza³ | Luana A. Biondo³ | Alexandre Abílio S. Teixeira³ | Edson A. Lima³ | Helena A. P. Batatinha³ | José C. Rosa Neto³ | Fábio S. Lira¹

¹Exercise and Immunometabolism Research Group, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, SP, Brazil

²Clinical and Sports Nutrition Research Laboratory (Labince), Nutrition Faculty (FANUT) – Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brazil

³Immunometabolism Research Group, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

Correspondence

Loreana Sanches Silveira, Exercise and Immunometabolism Research Group, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rua Roberto Simonsen, 305, 19060-900 Presidente Prudente, SP, Brazil. Email: loreana_joly@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2013/04765-1, 2013/09367-4, 2013/10861-3, 2013/25310-2 and 2014/01246-6

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) play a major role in metabolism and inflammatory control. Exercise can modulate PPAR expression in skeletal muscle, adipose tissue, and macrophages. Little is known about the effects of PPAR- α in metabolic profile and cytokine secretion after acute exercise in macrophages. In this context, the aim of this study was to understand the influence of PPAR- α on exercise-mediated immune metabolic parameters in peritoneal macrophages. Mice C57BL/6 (WT) and PPAR- α knockout (KO) were examined in non-exercising control ($n = 4$) or 24 hours after acute moderate exercise ($n = 8$). Metabolic parameters (glucose, non-esterified fatty acids, total cholesterol [TC], and triacylglycerol [TG]) were assessed in serum. Cytokine concentrations (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , and MCP-1) were measured from peritoneal macrophages cultured or not with LPS (2.5 μ g/mL) and Rosiglitazone (1 μ M). Exercised KO mice exhibited low glucose concentration and higher TC and TG in serum. At baseline, no difference in cytokine production between the genotypes was observed. However, IL-1 β was significantly higher in KO mice after LPS stimulus. IL-6 and IL-1 β had increased concentrations in KO compared with WT, even after exercise. MCP-1 was not restored in exercised KO LPS group. Rosiglitazone was not able to reduce proinflammatory cytokine production in KO mice at baseline level or associated with exercise. Acute exercise did not alter mRNA expression in WT mice. Conclusion: PPAR- α seems to be needed for metabolic glucose homeostasis and anti-inflammatory effect of acute exercise. Its absence may induce over-expression of pro-inflammatory cytokines in LPS stimulus. Moreover, moderate exercise or PPAR- γ agonist did not reverse this response.

KEYWORDS

acute exercise, cytokine, peritoneal macrophages, transcription factor

1 | INTRODUCTION

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of the nuclear hormone receptor, which play a major role in metabolism.¹ There are 3 different isoforms from this group of transcriptional factors, PPAR- α , PPAR- β/δ , and PPAR- γ , presenting functions such as fatty acid oxidation, lipogenesis, and regulation of energy homeostasis, respectively.¹

PPAR- α is highly expressed in liver and can promote fatty acid oxidation by increasing genes responsible for intracellular fat acid transportation to peroxisome and mitochondria.² Furthermore, PPAR- α is also found in macrophages and dendritic cells.³ Most recently, studies have shown that PPARs are involved in

inflammatory control by regulating the intensity, duration, and consequences of inflammatory responses.² PPAR- α deficient mice present unbalanced ratio Th1/Th2, resulting in upregulation of pro-inflammatory Th1.⁴ This fact may be explained by a downregulation of transcription factors related to Th1, such as T-bet (T-box expressed in T cells), with an increase of GATA-3, an upregulator of Th2 cytokines.¹ Treatments with agonists of PPAR- α have demonstrated reductions in plasma concentrations of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ).⁵ Additionally, it is well documented that chronic exercise, especially at moderate intensity, can improve insulin sensitivity and fat acid metabolism. Furthermore, the mechanisms that control these alterations are mediated by PPAR- α in human skeletal muscle.⁶

PPAR- γ is highly expressed in macrophages, and besides its anti-atherosclerotic function, such as increased cholesterol efflux and reduction of foam cell formation, an anti-inflammatory role has also been described.⁷ The suggested mechanisms explaining the anti-inflammatory function of PPAR- γ are the inhibition of NF κ B, AP-1, and STAT, and the transrepression of LPS-induced inflammatory response in macrophages by stabilization of co-repressor complexes (NCoR-HDAC3-TBL).⁸ Furthermore, the thiazolidinediones (TZDs), a PPAR- γ agonist used as an anti-diabetic drug, induce inhibition of TNF- α and iNOS in macrophages.⁹

The roles of PPAR- α on metabolism are well known, although the acute exercise-mediated aspects that could regulate these transcriptional factors are a field that has not been deeply explored. Nonetheless, a few studies involving exercise have investigated the modulation of PPAR gene expression in several tissues.^{10–12} Therefore, the aim of the present study was to understand the influence of PPAR- α on exercise-mediated metabolic profile variations, as well as cytokine production and gene expression in peritoneal macrophages.

2 | METHODS

2.1 | Animals

Male C57BL/6 J wild type (WT) and PPAR α knockout (KO) mice (10 to 12 weeks of age) were kindly provided by Professor William Festuccia from the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo and maintained on a 12–12 h light-dark cycle (lights on at 6:00 am). The experimental procedures were submitted to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the University of São Paulo, Institute of Biomedical Sciences (112/13CEUA).

2.1.1 | Experimental groups

Mice were subdivided into 2 categories: non-exercised and 24 hours post exercise. All animals were adapted to a treadmill during 5 days (10 minutes/day – 10 m/min), and on the sixth day they performed a

maximum speed test (5 minutes of warm-up increasing 3 m/min each minute until exhaustion detected by biomechanical alteration). After 72-hour resting, it was performed an exercise session at 60% of maximum speed during 1 hour (except non-exercise group). The intensity and duration of the exercise session were chosen in accordance to previous studies involving alterations in healthy untrained subjects^{13,14} (Figure 1).

2.1.2 | Euthanasia

Animals were anaesthetised by isoflurane inhalation and euthanized by decapitation 24 hours after the exercise session (6-hour fasting). Mice were weighted, and we collected weighted adipose tissue (mesenteric, subcutaneous, retroperitoneal, and brown adipose tissue), liver, and gastrocnemius. The adiposity index (AI) was calculated by the sum of the white adipose tissues deposits.

2.1.3 | Metabolic profile analysis

Glucose, TG, non-esterified fatty acids (NEFA) (WAKO®), TC, and high density lipoprotein (HDL) were analysed by colorimetric method, obtained from Labtest®, Brazil. Levels of LDL were estimated by Friedewald (1972)¹⁵ equation: $LDL = TC - HDL - TG/5.0$ (mg/dL).

2.1.4 | Peritoneal macrophage isolation and culture

Cytokine production was assessed in macrophages obtained by washing the peritoneal cavity with 6-mL RPMI 1640 culture medium (Sigma), enriched with 2% heat-inactivated FBS (Corning Laboratory Sciences Co., NY, USA) and antibiotics. The lavage fluid was centrifuged at 100 $\times$ g, the supernatant aspirated, the cell pellet resuspended in 1 mL of RPMI 1640 medium containing 10% heat-inactivated FBS, and a live cell count determined by Trypan blue exclusion and haemocytometer (5×10^6). Macrophage-rich cultures were obtained by incubating peritoneal cells in 24-well polystyrene culture plates for 2 hours at 37 °C in a 5% CO₂, humidified air environment. Nonadherent cells were removed by washing. Adherent cells were then incubated with RPMI 10% serum only or RPMI 10% serum plus

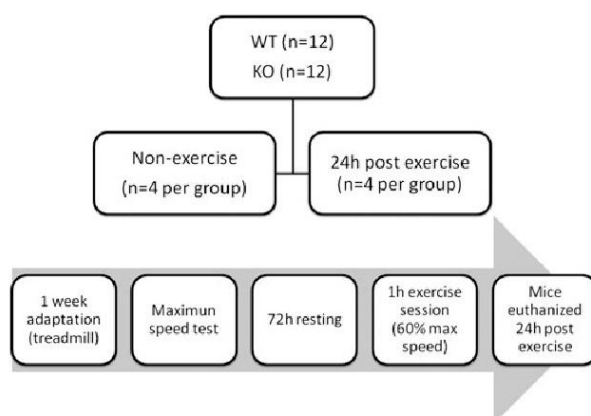


FIGURE 1 Experimental design

2.5 g/mL of lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli*, serotype 0111: B4, Sigma Chemical Company, USA) for 24 hours.¹⁶ Medium was collected to determine IL-6, IL-10, IL-1 β , MCP-1, and TNF- by ELISA (R&D System®) according to the manufacturer.

2.1.5 | Real-time RT-PCR

Total RNA from the macrophages were extracted with Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA), following the method described by Chomczynski and Sacchi (1987).¹⁷ Reverse transcription to cDNA was performed using the high-capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Gene expression was evaluated by real-time PCR according to Higuchi et al (1992),¹⁸ using Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) as fluorescent dye. Primer sequences are shown in Table S1 (Table S1). Quantification of gene expression was carried out using the GAPDH gene as internal control, as previously described by Liu and Saint (2002).¹⁹

2.2 | Statistical analysis

Results are presented as mean $\pm$ SEM (standard error of the mean), and statistical differences between groups were determined by 1-way ANOVA followed by Fisher LSD method. For data presented in Figure 2, we used the unpaired t test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3 | RESULTS

The sample was homogeneous, showing no statistical differences for total weight, adiposity, liver, and muscle between WT and KO mice (Table S2). However, the average of maximum speed reached in the test was higher in KO group (Figure 2).

3.1 | Metabolic profile

Despite similar baseline values between the genotypes for all parameters assessed, the 24 hours post exercise levels of glycemia decreased in KO mice. TG also seemed to decrease in WT post exercise (not significant); otherwise, KO mice presented higher values of TG than WT

24 hours post exercise ($P < 0.001$), indicating disturbance on fatty acid metabolism (Figure 3).

3.2 | Anti-inflammatory effect in acute bout of exercise is PPAR α dependent

We sought to investigate if WT mice submitted to acute exercise were able to modulate cytokine concentrations. The results revealed that a comparison in cytokine profile between PPAR- α KO and WT non-exercise mice was not different (Table S1). Additionally, we performed a bout exercise to verify if the lack of PPAR- α could affect the inflammatory action, and we found that exercise-mediated anti-inflammatory action is impaired in the absence of PPAR- α by increase of IL-6 and IL-1 β (Figure 4).

3.3 | PPAR- α -KO mice are protected to LPS-induced inflammatory action

To confirm the contribution of PPAR- α on anti-inflammatory status, we submitted both PPAR-KO and WT mice to LPS treatment and found that LPS-induced inflammatory stimulus is intensified in the absence of PPAR- α , with activation of IL1 β expression (Table S1), demonstrating that absence of PPAR- α is important on anti-inflammatory effects.

Additionally, we sought to elucidate if the physiological approach with a bout of exercise maintains the inflammatory status mediated by PPAR- α in KO after LPS treatment. It was observed an elevation of IL-1 β from exercised in KO LPS compared with non-exercise WT LPS. We also found a tendency in the proinflammatory profile in KO mice when compared with LPS and exercise treatment between both genotypes (TNF- α ; $P = 0.07$ /IL-1 β ; $P = 0.081$). Moreover, MCP-1 of KO mice submitted to exercise and LPS were higher ($P < 0.05$) (Figure 5). Thus, these findings show that the anti-inflammatory effect mediated by acute exercise is impaired when associated with LPS in KO mice.

3.4 | PPAR- γ pharmacological activation blunted the inflammatory effect of LPS

Looking for the pharmacological activation of the PPAR- γ on inflammatory profile, we treated macrophages from WT and KO mice with rosiglitazone (1 μ M) and LPS. The results showed that PPAR- γ activation attenuated LPS-mediated inflammatory action by the reduction of IL-6 in WT (Figure 6). Additionally, the treatment with rosiglitazone in PPAR- α KO did not promote downregulation in IL-1 β (Figure 6). Furthermore, we tested the effects of exercise and rosiglitazone in LPS-stimulated macrophages and found higher concentrations of TNF- α in animals PPAR- α KO (Figure 7).

3.4.1 | Gene expression on peritoneal macrophages

To confirm whether gene expression of PPARs and genes related in peritoneal macrophages can be modulated by acute exercise, we analysed WT animals submitted to a session of moderate exercise. It seems that 24 hours was not enough to promote changes in exercise-mediated mRNA expression of PPARs; nonetheless, the results

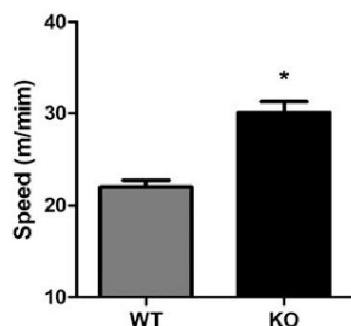


FIGURE 2 Mean and standard error of maximum speed test in WT and KO mice performed 72 h previously to the acute exercise session. (unpaired test t.* $P < 0.05$)

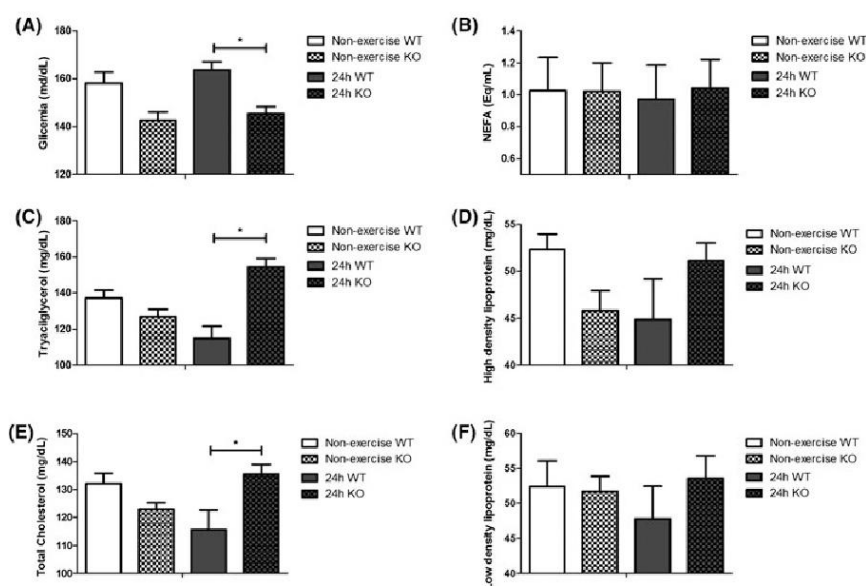


FIGURE 3 Metabolic variables from serum of WT and KO mice in non-exercise and 24 h after acute exercise protocol. Glycemia A, non-esterified fatty acids (NEFA), B, triacylglycerol, C, high-density lipoprotein, D, total cholesterol, E, low-density lipoprotein F. * $P < 0.05$

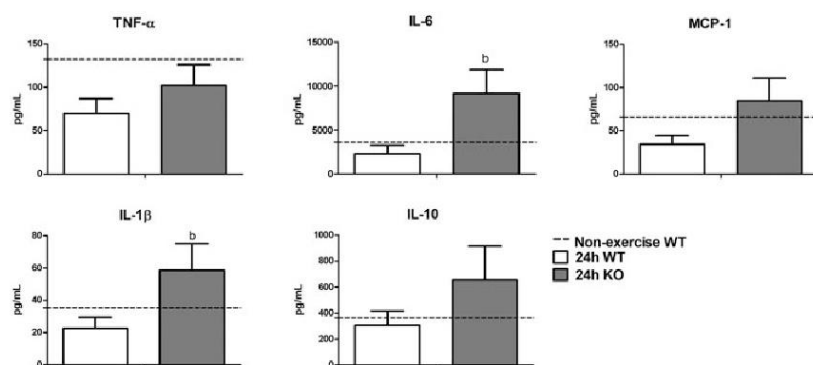


FIGURE 4 Absence of the PPAR- α leads to impaired anti-inflammatory action after acute exercise. Cytokine secretion from cultured peritoneal macrophages of WT and KO mice. Cytokine concentrations in the culture medium were determined by ELISA ($n = 4-8$ /group). Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. a = different from non-exercise WT b = different from 24 h WT. $P < 0.05$

can indicate a tendency in important modulations in genes related to PPAR co-activation, such as PGC1- α , as well as ACOX-1, an enzyme related to fatty acid β -oxidation (Figure S1).

4 | DISCUSSION

In the present study, PPAR- α KO mice showed impaired glucose and lipid profile as well as abolish anti-inflammatory response from acute

aerobic exercise (60% $\text{VO}_{2\text{max}}$ - 1 hour) in macrophages. Interestingly, PPAR- α KO exhibited great performance during maximum speed test on treadmill when compared with the control group.

During acute exercise at moderate intensity, oxidative metabolism is predominant, leading to fatty acid mobilization and oxidation by skeletal muscle. Our data showed differences on substrate concentration in serum between the different genotypes in response to exercise caused by lower glycemia and higher concentrations of TG and TC in PPAR- α KO mice.

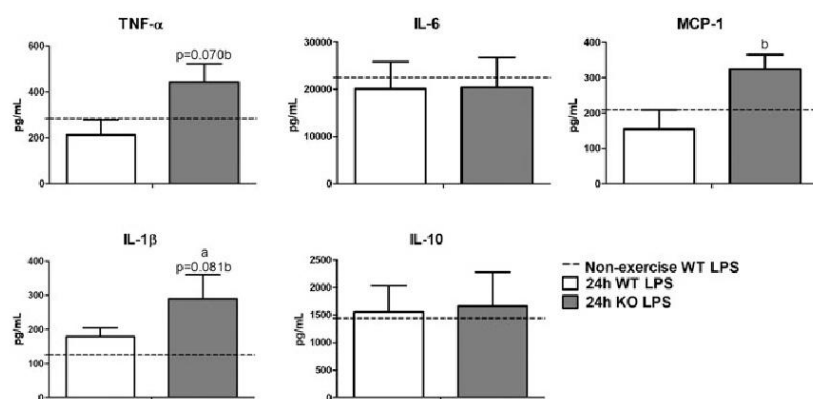


FIGURE 5 Absence of the PPAR- α leads to impaired anti-inflammatory action of acute exercise in LPS-treated macrophages. Cytokine secretion from cultured peritoneal macrophages of WT and KO mice stimulated with LPS (2.5 μ g/mL). Cytokine concentrations in the culture medium were determined by ELISA ($n = 4-8$ /group). Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. a = different from non-exercise WT LPS. b = different from 24 h WT LPS, $P < 0.05$

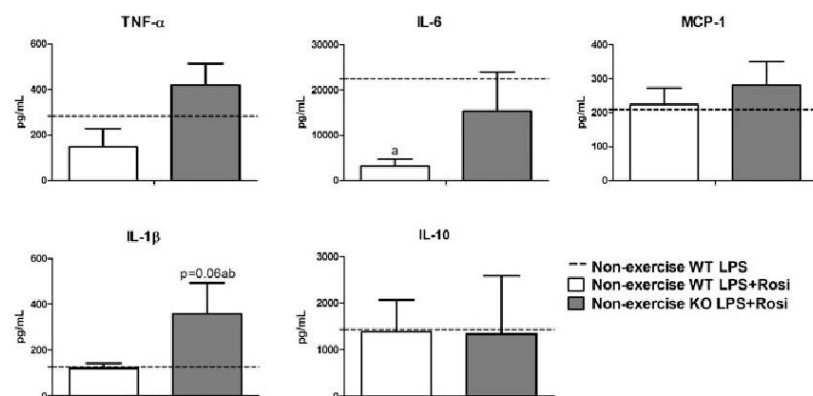


FIGURE 6 PPAR- γ activation seems to attenuate the LPS-mediated inflammatory in WT mice but not in KO. Data shown as means $\pm$ SEM of cytokine production. Cytokine secretion from cultured peritoneal macrophages of WT and KO mice stimulated with LPS (2.5 μ g/mL) and/or rosiglitazone (1 μ M). Cytokines concentrations in the culture medium were determined by ELISA ($n = 4-8$ /group). Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. a = different from non-exercise WT LPS. b = different from non-exercise WT LPS, $P < 0.05$

PPAR- α is a transcriptional factor that maintain glucose levels under acute metabolic stress (including starvation),²⁰ which explains the hypoglycemia in PPAR- α KO mice post-exercise.²¹ Furthermore, PPAR- α is involved in hepatic metabolism,²² and, as a consequence, higher concentrations of TC and TG in serum of KO animals 24 hours after exercising may be due to an increase in liver secretion of lipids. NEFA trend was not discrepant and did not decrease in the PPAR- α KO group. This unchanged concentration of NEFA on circulation along with the impaired fatty acid metabolism may lead to a higher serum TG in 24 hours post exercise. It is known that NEFA could be oxidated by liver through β -oxidation, or esterified to TG by glycerol-3-phosphate.²³ The absence of PPAR α impairs β -oxidation, and, consequently, NEFA

and acetyl-CoA accumulated from the glycolysis can be converted to TG. Possibly a lower FA intake by the reduced activity of LPL in skeletal muscle may explain the TG elevation observed in KO mice after a bout of exercise.

In contrast to the impaired lipid metabolism, the KO group had a better performance during the maximum speed test ($P < 0.01$), a fact that could be explained by the nuclear receptor/miRNA circuit (miR-208b and miR-499) able to control type I muscle fibres stimulated by exercise via PGC1- α and suppressed by PPAR- α .²⁴ PGC1- α is also a coactivator of PPAR- β/δ , the most abundant PPAR in skeletal muscle, known as an inducer of mitochondrial biogenesis and type I fibre formation.²⁵

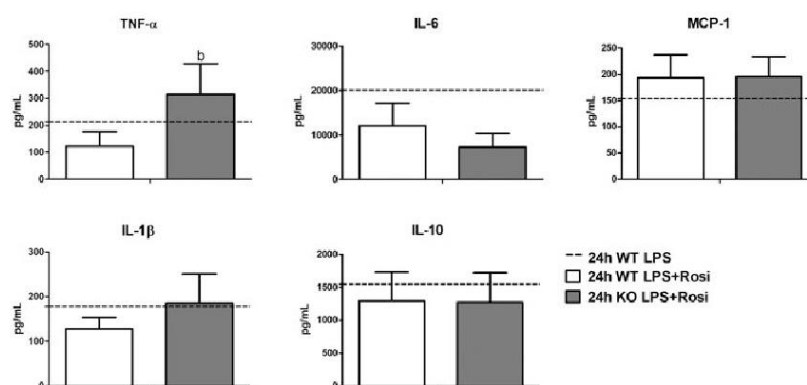


FIGURE 7 Lack of PPAR- α seems to attenuate the anti-inflammatory effect of exercise combined with rosiglitazone in LPS-stimulated macrophages. Cytokine secretion from cultured peritoneal macrophages of WT and KO mice stimulated with LPS (2.5 μ g/mL) and/or rosiglitazone (1 μ M). Cytokine concentrations in the culture medium were determined by ELISA ($n = 4-8$ /group). Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. a = different from 24 h WT LPS. b = different from 24 h WT LPS + Rosi. $P < 0.05$

Exercise is a fundamental protection against cardiovascular diseases, and its positive effects on anti-inflammatory response have been revealed recently.²⁶ Our group has shown that, in humans, variation in cytokine levels can be observed right after exercise, and anti-inflammatory effects are independent of intensity.²⁷ Petersen et al.²⁸ observed that the cytokine response to sepsis and exercise was different, and that the exercise-mediated cytokine in the circulation does not include TNF- α and IL-1 β increase levels, despite IL-6 increase in both conditions. In the present study, we analysed the cytokine production in peritoneal macrophages, showing important responses to exercise by the immune cells. To test the acute response, we collected macrophages in non-exercise and 24 hours post exercise, as well as performed stimulation with LPS to simulate an inflammatory response mediated by TLR4 receptor. In a comparative study with lipid homeostasis and immune response, mice and humans macrophages reduced production of inflammatory mediators via PPAR- α , justified by the inhibition of 2 important pathways: NF- κ B and AP-1.²⁹

Our results showed no significant differences on cytokine release from macrophages between WT animals and KO in basal conditions (Table S3). Previous studies have shown anti-inflammatory effect mediated by exercise in macrophages in chronic³⁰ and chemotaxis in acute exercise.³¹ We tested the effects of acute exercise in WT and KO mice and observed an impaired inflammatory resolution in KO mice (Figure 3), confirming the importance of PPAR- α in the anti-inflammatory response.¹

Trying to deeply understand the anti-inflammatory response mediated by exercise, we induced the macrophages to a pro-inflammatory stimulus using LPS. At baseline conditions (non-exercised), the LPS increased the secretion of IL-1 β in KO mice (Table S3). However, exercise in association with LPS increased MCP-1 secretion and tended to increase TNF- α and IL-1 β concentration in KO mice compared with WT exercised mice (Figure 5). These findings might suggest that exercise is not effective to induce an anti-inflammatory response in the absence of PPAR- α .

In adipose tissue, MCP-1 is an important key for macrophage infiltration and development of insulin resistance.³² Additionally, overexpression of MCP-1 in mice has increased macrophage infiltration in adipose tissue and enhanced TNF- α gene expression.³³ Higher concentrations of MCP-1 were found in our model in KO LPS exercised mice. Although exercise shows an inflammatory effect that is tissue dependent, Rosa neto et al (2009)³⁴ demonstrated that after exhaustive exercise, the ratio IL-10/TNF- α increased concentrations in skeletal muscle compared with baseline, whereas decreased in adipose tissue. The same author suggested that TLR4 and NF- κ B are important inflammatory pathways in exercised-mediated inflammation in adipose tissue.³⁵ However, further studies are necessary to deeply understand the acute effect of exercise in macrophages.

IL-1 β is an important pro-inflammatory cytokine which production is regulated by 2 distinct steps: first, the stimulus from TLR, and second, the inflammasome activation is necessary for its secretion and bioactivity.³⁶ The effect of exercise on the NLRP3 inflammasome is not well described; however, the chronic exercise in high fat diet obesity-induced mice has shown to be an efficient NLRP3 inhibitor possibly explained by the increased utilization of FFA, which activates TLR4 and subsequently IKK/NF- κ B.³⁷

Once exercise by itself was not able to reverse the inflammatory response induced by LPS in KO mice, we treated the cultured macrophages with Rosiglitazone, a PPAR- γ agonist used to improve insulin sensitivity.³⁸ In non-exercised KO mice, rosiglitazone was not able to reduce IL-1 β production ($P = 0.06$) (Figure 6), but the same effect was not found when associated with exercise. Thus, WT animals (exercise + LPS + Rosi) presented a tendency to reduce inflammatory parameters, whereas, KO mice had higher concentration of TNF- α (Figure 7).

Studies have shown that Rosiglitazone induces M2 macrophage polarization and consequently reduces inflammatory state.^{39,40} Nonetheless, this effect was not observed in KO mice, once in this group TNF- α and IL-1 β levels were elevated, suggesting that NF- κ B activity was upregulated.⁴¹ It is known that PPAR activators inhibit

inflammatory response genes by downregulating NF- κ B, STAT and AP-1 signalling pathways.⁴² Greten et al (2007) showed that IKK β abrogation in mice myeloid cells elevated sensitivity to LPS-induced and consequently amplified pro-IL-1 β processing in macrophages and neutrophils.⁴³

PPAR gene expression was also analysed in peritoneal macrophages from WT animal in response to a session of moderate exercise (Figure S3). The expression of fatty acid β -oxidation enzymes, such as ACOX-1, tended to be increased by exercise, indicating that oxidative metabolism is still essential in macrophages. However, PPAR- α and PPAR- γ expression was not modulated by exercise in this short period. The hypothesis to explain this trend is that the exercise-mediated action of AMP-activated protein kinase (AMPK) might phosphorylates p300 (a PPAR co-activator) in serine-89, reducing its interaction with PPAR- γ .⁴⁴ In the same context, Namgaladze et al (2013) tested the effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR), an activator of AMPK, which simulates the effect of exercise, on human monocyte differentiation and concluded that AICAR attenuates mRNA expression of PPAR- γ in primary human monocytes cultured with M-CSF.⁴⁵

In humans, it was observed that 4 weeks of training was able to improve oxidative capacity even without changes on PPAR- α mRNA or protein expressions on skeletal muscle.⁴⁶ However, different isoforms of the PPAR α co-activator, PGC-1 α , has been described as activated by a single bout of exercise in skeletal muscle.⁴⁷

PGC-1 α is a regulator of mitochondrial biogenesis in tissues with high-energy demands, such as heart and skeletal muscle.⁴⁸ It was observed that PGC1- α can also be expressed in macrophages, playing an important anti-atherosclerotic role inhibiting macrophage foam cell transition.⁴⁹ However, studies that observed the link between exercise and PGC-1 α gene expression in macrophages are scarce. Norrbon and colleagues (2004)⁵⁰ verified that acute exercise with and without blood restriction increased the PGC1- α mRNA expression in human skeletal muscle (in a time-dependent manner) between 30 minutes and 2 hours after exercise, independently of oxygen. In our study, macrophages PGC-1 α mRNA expression was unchanged by moderate exercise.

Overall, these findings suggest that PPAR- α is required for metabolic glucose homeostasis after acute exercise, as well as exert an important role on exercise-mediated anti-inflammatory response, and the lack of this transcriptional factor probably induces overexpression of proinflammatory cytokines. Additionally, LPS stimulus in macrophages increased inflammation in KO mice, which is not reverted by moderate exercise or PPAR- γ agonist, rosiglitazone.

ACKNOWLEDGEMENTS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (FAPESP 2014/01246-6; FAPESP 2013/09367-4; FAPESP 2013/25310-2; FAPESP 2013/04765-1; FAPESP 2013/10861-3).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ORCID

Loreana S. Silveira  <http://orcid.org/0000-0003-4429-0153>

REFERENCES

- Yessoufou A, Wahli W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13071.
- Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. Oct 2002;2(10):748-759.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. Oct 1999;20(5):649-688.
- Yessoufou A, Hichami A, Besnard P, Moutairou K, Khan NA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: modulation of T cell differentiation. *Endocrinology*. Sep 2006;147(9):4410-4418.
- Madej A, Okopien B, Kowalski J, et al. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther*. Jun 1998;36(6):345-349.
- Horowitz JF, Leone TC, Feng W, Kelly DP, Klein S. Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Aug 2000;279(2):E348-E355.
- Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. Aug 2000;106(4):523-531.
- Pascual G, Fong AL, Ogawa S, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*. Sep 29 2005;437(7059):759-763.
- Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol*. Jul 2000;20(13):4699-4707.
- Li G, Wang J, Ye J, Zhang Y. PPARalpha protein expression was increased by four weeks of intermittent hypoxic training via AMPKalpha2-dependent manner in mouse skeletal muscle. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122593. doi: 10.1371/journal.pone.0122593. eCollection 0122015.
- Batatinha HA, Lima EA, Teixeira AA, et al. Association between aerobic exercise and rosiglitazone avoided the NAFLD and liver inflammation exacerbated in PPAR-alpha knockout mice. *J Cell Physiol*. May 23 2016;232(5):1008-1019.
- Sasaki T, Nakata R, Inoue H, Shimizu M, Inoue J, Sato R. Role of AMPK and PPARgamma1 in exercise-induced lipoprotein lipase in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;306(9):E1085-E1092. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00691.02013>. Epub 02014 Mar 00618.
- Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Donohue KM, et al. The effects of acute moderate exercise on leukocyte and lymphocyte subpopulations. *Med Sci Sports Exerc*. May 1991;23(5):578-585.
- Lyngso D, Simonsen L, Bulow J. Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: the effect of exercise. *J Physiol*. Aug 15 2002;543(Pt 1):373-378.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. Jun 1972;18(6):499-502.
- Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. Nov 2008; Chapter 14: Unit 14.1:1-18.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. Apr 1987;162(1):156-159.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. Apr 1992;10(4):413-417.
- Liu W, Saint DA. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*. Jun 7 2002;294(2):347-353.

20. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. Jun 1999;103(11):1489-1498.
21. Guerre-Millo M, Rouault C, Poulain P, et al. PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. Dec 2001;50(12):2809-2814.
22. Harrington WW, Britt CS, Wilson JG, et al. The effect of PPARalpha, PPARdelta, PPARgamma, and PPARpan agonists on body weight, body mass, and serum lipid profiles in diet-induced obese AKR/J mice. *PPAR Res*. 2007;2007:97125.
23. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*. Jan 2014;4(1):177-197.
24. Gan Z, Rumsey J, Hazen BC, et al. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. *J Clin Invest*. Jun 2013;123(6):2564-2575.
25. Wang YX, Zhang CL, Yu RT, et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*. Oct 2004;2(10):e294.
26. Di Raimondo D, Tuttolomondo A, Butta C, et al. Metabolic and anti-inflammatory effects of a home-based programme of aerobic physical exercise. *Int J Clin Pract*. Dec 2013;67(12):1247-1253.
27. Cabral-Santos C, Gerosa-Neto J, Inoue DS, et al. Similar anti-inflammatory acute responses from moderate-intensity continuous and high-intensity intermittent exercise. *J Sports Sci Med*. Dec 2015;14(4):849-856.
28. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985). Apr 2005;98(4):1154-1162.
29. Rigamonti E, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jun 2008;28(6):1050-1059.
30. Chen MF, Chen HL, Jen CJ. Exercise training upregulates macrophage MKP-1 and affects immune responses in mice. *Med Sci Sports Exerc*. Dec 2010;42(12):2173-2179.
31. Ferrandez F. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. *Acta Physiol Scand*. 1999;166(1):47-53.
32. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. Jun 2006;116(6):1494-1505.
33. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*. Sep 8 2006;281(36):26602-26614.
34. Rosa Neto JC, Lira FS, Oyama LM, et al. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol*. Jul 2009;106(5):697-704.
35. Rosa JC, Lira FS, Eguchi R, et al. Exhaustive exercise increases inflammatory response via Toll like receptor-4 and NF-kappaBp65 pathway in rat adipose tissue. *J Cell Physiol*. 2011;226(6):1604-1607. <https://doi.org/10.1002/jcp.22490>
36. Sahoo M, Ceballos-Olvera I, del Barrio L, Re F. Role of the inflammasome, IL-1beta, and IL-18 in bacterial infections. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:2037-2050.
37. Ringseis R, Eder K, Mooren FC, Kruger K. Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2015;21:58-68.
38. Rocchi S, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: a versatile metabolic regulator. *Ann Med*. Oct 1999;31(5):342-351.
39. Ballesteros I, Cuartero MI, Pradillo JM, et al. Rosiglitazone-induced CD36 up-regulation resolves inflammation by PPARgamma and 5-L-O-dependent pathways. *J Leukoc Biol*. Apr 2014;95(4):587-598.
40. Lefevre L, Gales A, Olagner D, et al. PPARgamma ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal Candida elimination. *PLoS One*. 2010;5(9):e12828.
41. Okamoto H, Iwamoto T, Kotake S, Momohara S, Yamanaka H, Kamatani N. Inhibition of NF-kappaB signaling by fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, presents a therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. May-Jun 2005;23(3):323-330.
42. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*. Oct 2000;49(10):497-505.
43. Greten FR, Arkan MC, Bollrath J, et al. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell*. Sep 7 2007;130(5):918-931.
44. Yang W, Hong YH, Shen XQ, Frankowski C, Camp HS, Leff T. Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors. *J Biol Chem*. Oct 19 2001;276(42):38341-38344.
45. Namgaladze D, Kemmerer M, von Knethen A, Brune B. AICAR inhibits PPARgamma during monocyte differentiation to attenuate inflammatory responses to atherogenic lipids. *Cardiovasc Res*. Jun 1 2013;98(3):479-487.
46. Helge JW, Bentley D, Schjerling P, et al. Four weeks one-leg training and high fat diet does not alter PPARalpha protein or mRNA expression in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. Sep 2007;101(1):105-114.
47. Miura S, Kai Y, Kamei Y, Ezaki O. Isoform-specific increases in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) mRNA in response to beta2-adrenergic receptor activation and exercise. *Endocrinology*. Sep 2008;149(9):4527-4533.
48. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*. Feb 2003;24(1):78-90.
49. McCarthy C, Lieggi NT, Barry D, et al. Macrophage PPAR gamma Co-activator-1 alpha participates in repressing foam cell formation and atherosclerosis in response to conjugated linoleic acid. *EMBO Mol Med*. Sep 2013;5(9):1443-1457.
50. Norrbom J, Sundberg CJ, Ameln H, Kraus WE, Jansson E, Gustafsson T. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). Jan 2004;96(1):189-194.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Silveira LS, Pimentel GD, Souza CO, et al. Effect of an acute moderate-exercise session on metabolic and inflammatory profile of PPAR- α knockout mice. *Cell Biochem Funct*. 2017;1-8. <https://doi.org/10.1002/cbf.3308>

9. 3. Revisão publicada na *Eukaryotic Gene Expression*

Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression, 26(2):115–132 (2016)

Macrophage Polarization: Implications on Metabolic Diseases and the Role of Exercise

Loreana Sanches Silveira,^{a,b} Barbara de Moura Mello Antunes,^b André Luis Araujo Minari,^c Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos,^{c,d} José Cesar Rosa Neto,^{a,*} & Fábio Santos Lira^b

^aImmunometabolism Research Group, Institute of Biomedical Sciences, Department of Cell Biology and Development, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil; ^bExercise and Immunometabolism Research Group, Department of Physical Education, University of the State of São Paulo, Rua Roberto Simonsen, 305, 19060-900 Presidente Prudente, SP, Brazil; ^cPsychobiology Department, Federal University of São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brazil; ^dBioscience Department, Campus Baixada Santista, Federal University of São Paulo, UNIFESP, Santos, Brazil

*Address all correspondence to: José Cesar Rosa Neto, Av. Professor Lineu Prestes, 1524, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil; Tel.: (+55) (11) 3091-0883; E-mail: josecesar23@hotmail.com.

ABSTRACT: Macrophages are cells of the innate immune response that trigger inflammation resolution. The phenotype of “classically activated macrophages” (M1) has anti-tumoricidal and anti-bactericidal activities. On the other hand, “alternatively activated macrophages” (M2) are involved in tissue remodeling and immunomodulatory functions. The change in the polarization of macrophages varies according to the diversity of cytokines present in the microenvironment or by the stimuli of an antigen. It involves such factors as interferon-regulatory factors, peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), hypoxia-inducible factors (HIFs), and signal transducers and activators of transcription (STATs). Switching the phenotype of macrophages can help attenuate the development of an inflammatory disease. Exercise can promote alterations in the number of innate immune cells and stimulates phagocytic function. Chronic exercise seems to inhibit macrophage infiltration into adipose tissue by attenuating the expression of F4/80 mRNA. Furthermore, exercise may also increase the expression of M2 markers and reduce TNF- α and TLR4 mRNA expression, which activates the inflammatory pathway of NF- κ B. Chronic exercise reduces β 2-adrenergic receptors in monocytes and macrophages by modulating TLR4 signaling as well as suppressing IL-12 production, a stimulator of interferon γ . In this review, we discuss macrophage polarization in metabolic diseases and how exercise can modulate macrophage plasticity.

KEY WORDS: macrophages, immune system, inflammation, exercise, transcriptional factor

I. INTRODUCTION

Despite different characterizations and features of body systems, it is clear that there is direct communication between them. For a long time, the immune system was studied by itself, unrelated to any other. Since the 1980s, however, the anatomic and functional relationships in immunity have been studied, and the role of immune cell types on metabolism has been clarified.

Central metabolic tissues, considered important for energy homeostasis, such as liver and adipose tissue, have a huge number of infiltrated cells from immune system (innate and adaptive), and their activation may vary with metabolic changes.¹ More recent studies have included skeletal muscle in this

context, especially for being capable of restoring glucose homeostasis on metabolic dysfunctions, as in type 2 diabetes.² In this context, metabolic disorders affect not only the number but also the function and metabolism of immune cells. Nonetheless, despite the presence and functional contributions of many different immune cells (e.g., lymphocytes, neutrophils, eosinophils, mast cells) to metabolic tissue homeostasis, the macrophage is both numerically and functionally dominant.³ This cell type is one of the most studied due its sensitivity to hypertrophy of adipose tissue and subsequent considerable infiltration and polarization (covered in detail throughout the text). Furthermore, studies have shown that adipose tissue from lean individuals secretes insulin-sensitizing adipokines, influenced by alternatively

activated macrophages whereas adipose tissue from obese individuals secretes an inflammatory mediator via classically activated macrophages.⁴

It is also clear that the key for this trigger in metabolic dysfunctions is the impairment of lipid and/or glycemic metabolism; the first is closely connected to atherosclerosis and the second to insulin resistance, which is related to obesity and diabetes type 2. According to Pedersen (2006),⁵ there is a link between inflammation, insulin resistance, and atherosclerosis, i.e., a state referred to as chronic low-grade inflammation. This state is characterized by conditions in which a 2- to 3-fold increase in the systemic concentrations of inflammatory signaling molecules (i.e., cytokines, chemokines, acute phase reactants, insulin resistance-associated adipokines, procoagulative factors, hypertensive agents) and with low serum levels of insulin sensitivity associated with adipokines such as adiponectin and visfatin.⁶

Macrophages play an important role in the states or diseases mentioned previously, and their polarization to the classical phenotype is also exhibited in some diseases such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease,⁷ and nonalcoholic steatohepatitis.⁸

Non-pharmacological therapies that aim to attenuate low-grade inflammation are based on lifestyle modification that emphasize diets low in saturated fats and low in refined sugars and/or decreasing the caloric balance through regular physical exercise.⁹ In this review, we summarize the polarization of macrophages on some metabolic disorders and discuss the mechanisms by which macrophages are classically activated. We also discuss the therapeutic implications of exercise on restoring the homeostasis by macrophage polarization due to exacerbated inflammatory response caused by immune cells in the development of chronic disease. The literature provides clear evidence that exercise can modulate some of the factors that influence the inflammatory response.

II. MACROPHAGE FUNCTION, POLARIZATION, AND MECHANISMS

Russian scientist Élie Metchnikoff first identified

macrophages as cells able to phagocytize, or engulf, undesirable cells. As such, they were considered the initial protective barrier of the organism.¹⁰ These cells originate from the bone marrow and are derived from myeloid progenitor cells; subsequently, they are differentiated into monocytes, which then flow into the bloodstream. Finally, as matured cells, the monocytes can infiltrate tissues and further differentiate into macrophages, for example, in inflammation. These cells have an efficient capacity for functional specialization, as demonstrated by their different phenotypes, various locations, and responses to stimuli.

It is known that specific resident cells that are established prenatally; they originate from erythromyeloid progenitor in the yolk sac without a monocytic intermediate.¹¹ Resident macrophages from the liver are named Kupffer cells; in the brain they are known as microglial cells, in the bone they are known as osteoclasts, and in the peritoneum they are known as peritoneal macrophages, etc.^{12,13} Due to the diversity of their functions, expressed receptors, and secreted production by macrophages, they are considered an essential immune cell, targeting several regulatory events such as phagocytosis, tumoricidal and bactericidal activity, tissue repair, antigen presentation, lymphocyte regulation, and inflammation and cytokine production.¹⁴

The functional capacity of macrophages may vary and may be influenced by a diversity of factors including some tumor products, antigens, and products of T cells (Th1 or Th2),¹⁵ resulting in alternatively activated macrophages (AAM) or M2, which are involved in tissue remodeling and immunomodulatory function. Another result may be classically activated macrophages (CAM) or M1, which have anti-tumoricidal and anti-bactericidal activity. This alternation of phenotype is associated with the cytokine that is most expressed in the microenvironment: interferon-gamma (IFN- γ), which is related to the M1 phenotype. Furthermore, bacterial lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin present in the outer membrane of Gram-negative bacteria, may also promote the polarization to the M1 phenotype.¹⁶ On the other hand, interleukin-4 (IL-4) and -13 (IL-13) are associated with M2 macrophages, and recent studies have shown that IL-10 plays an important

role in muscle growth and regeneration, indicating that the null IL-10 mutant has impaired the capacity of M2 to proliferate myoblasts.¹⁷

It is important to emphasize is that macrophages are plastics; in other words, they can change their phenotype and their physiology and energetic metabolism depending on the environment. M1 macrophages predominate in the glycolytic metabolism, which is typically a faster means of energy production due its importance in the first line of defense in the innate immune system. In contrast, M2 macrophages are oxidative and are associated with parasitic products, infections, and wound healing, given that a resolution phase and consequently longer-term functions are necessary.¹⁸ In aerobic glycolysis of the M1 phenotype, the activity of the respiratory chain is attenuated, resulting in the production of reactive oxygen species (ROS), which is also enhanced by elevation of the NADPH oxidase originating from the pentose phosphate pathway. Another metabolite from M1 is iNOS, which originates from the catabolism of arginine. In M2, arginase-1 is induced, producing urea, polyamines, and ornithine, which are essential for wound healing.¹⁸ Mosser and Edwards (2008)¹⁹ characterized the spectrum of macrophages as having three different features in addition to the classically activated macrophages M1 and alternatively activated M2. The first two (M1) are responses to IFN γ produced by either innate or adaptive immune cells (Th1),²⁰ the last (M2) is an immune response reaction that originates from IL-4 produced by Th2 cells or during an innate immune response by granulocytes. Additionally, based on their gene expression, M2 macrophages can present subtypes: M2a, M2b, and M2c. Each polarized macrophage population is induced by a different chemokine exposure and drives toward a specific response. M2a and M2b are induced by exposure to IL-4/IL-13 and TLR or IL-1R agonists, respectively, and they exert immunoregulatory functions and can lead to type II responses, whereas M2c macrophages (IL-10, TGF- β , and glucocorticoid hormones) are important in suppressing immune responses and promoting tissue remodelling.²¹ The additional population would be regulatory macrophages, which arise from IL-10 produced by regulatory T cells, and which also

secretes IL-10 to suppress immune responses and enables Th2 cell expansion.¹⁹

As previously mentioned, the change in macrophage polarization varies according to the diversity of cytokines present in the microenvironment or stimuli by an antigen, and it involves a considerable number of factors: interferon-regulatory factors, peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), hypoxia-inducible factors (HIFs), and signal transducers and activators of transcription (STATs).²² In the case of M1 polarization, gene expression may be mediated by IFN- γ or LPS. IFN- γ -mediated activation is related to the JAK-mediated pathway, and it includes DNA binding sites specific to STAT1 homodimers in the promoters of the gene encoding NOS2, the MHC class II transactivator (CIITA), and IL-12. On other hand, LPS-mediated polarization requires receptor TLR4, which activates transcription factors of a pro-inflammatory response (e.g., NF- κ B, IRF3 and AP1) and expresses IRF3 target genes (*CCL5* and *IFN β*) and the genes downstream of IFN β (*NOS2*, *MX1* and *MX2*). Researchers have shown that LPS-activated macrophages, when re-stimulated (a few hours after a previous stimulation) are less responsive in the gene expression of pro-inflammatory cytokines, in an attempt to decrease the risk of exacerbating inflammation while maintaining the essential anti-microbial response.²³ On the other hand, M2 macrophages are stimulated by IL-4 and IL-13 cytokines, regulated by STAT-6, and they have increased expression of such genes as arginase-1, resistin-like- α , and macrophage mannose receptor (Fig. 1).²²

A question that remains open concerns tissue-resident macrophages and monocyte-derived macrophages: Is each population is able to polarize in M1 or/and M2 functional phenotypes?²⁴ Among the diversity of situations by which macrophages can be polarized, one that has been intensively investigated is the regulation of immune cell activation in adipose tissue due to its associations with the insulin resistance in this tissue.²⁵ In a homeostatic state, adipose tissue macrophages are usually an M2 phenotype, and its inflammatory activation is associated with metabolic disease. Additionally, an important transcription factor called peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR- γ) is an important regulator

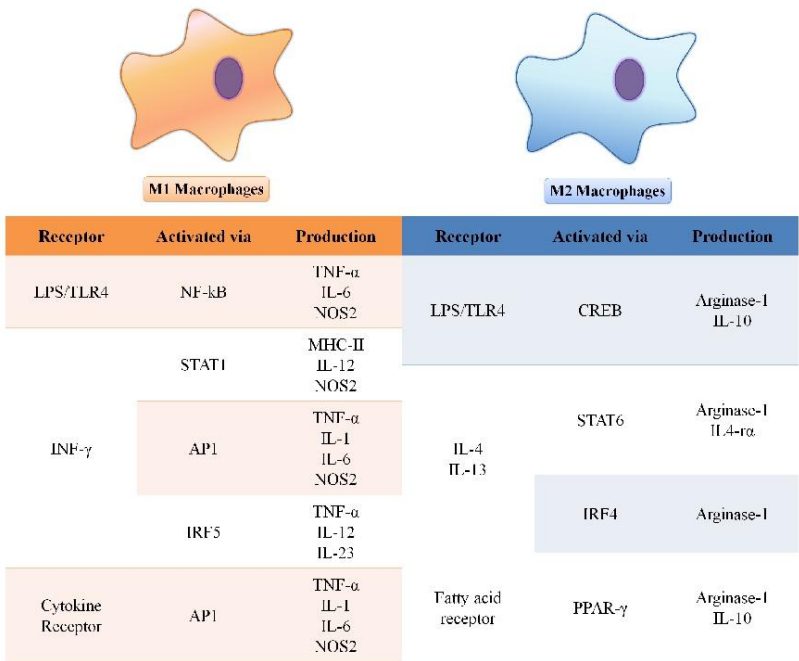


FIG. 1: Macrophage polarization comparing M1 and M2 signal pathways. The different pathways underlying macrophage polarization, the receptors involved, activation via and the induced products of activation.

of lipid metabolism in macrophages that inhibits pro-inflammatory gene expression by transrepression of NF-κB. Furthermore, it has been hypothesized that the switch from M1 to M2 in adipose tissue may be mediated by PPAR-γ.²⁶

The transcriptional factor PPAR, discovered in 1990, is a subfamily of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors, identified by three isotypes: PPARα, PPARβ/δ, and PPARγ. PPARα is highly expressed in muscles, the liver, heart, and kidney; PPARβ/δ is abundantly expressed throughout the body but at low levels in the liver; and PPARγ is abundantly expressed in adipose tissue and macrophages. All of these iso-

types have well-documented roles in lipid and glucose metabolism.²⁷⁻²⁹ PPAR transcriptional activity occurs through the formation of a heterodimer via a transcription factor connection to the 9-cis retinoic acid receptor (RXR) and to co-factors which may be activators (e.g., protein PGC-1α and SRC-1) or repressors such as nuclear receptor co-repressor (NCoR) and the silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor (SMRT).³⁰ Following the formation of the heterodimer, PPAR translocates to the cellular nucleus and binds to peroxisome proliferator response elements (PPREs) in the promoter region of the respective target genes, which promotes gene transcription for anti-inflammatory

substances, such as adiponectin,³¹ and is able polarize M2 macrophages.

In animal models, the participation of this transcription factor on macrophage polarization and inflammatory response has been well documented. Odegaard et al. (2007)³² demonstrated that transgenic mice with conditional deletion of PPAR- γ in macrophages are predisposed to the development of diet-induced obesity, insulin resistance, and glucose intolerance, as well as impaired alternative macrophage activation. Furthermore, the long-term maintenance of this phenotype requires the metabolic regulators PPAR- γ and PPAR- δ , as well as the coactivator protein PGC-1 β (PPAR γ coactivator-1 β).³³

III. CHRONIC INFLAMMATORY DISEASES: THE ROLE OF MACROPHAGES

Under normal conditions, a predominance of resident macrophages exists in states of low activity; the pro- and anti-inflammatory cytokines produced by the immune cells are also at equilibrium. However, the immune system responds to alterations in basal conditions, such as endocrine responses to pathologies or nutrient imbalance such as excess of body weight. When this condition of weight gain persists for a long period of time, it may trigger chronic low inflammation. A variety of metabolic disorders are related to chronic low inflammation: obesity, diabetes mellitus type 2, non-alcoholic steatohepatitis, atherosclerosis, among others. In this paper, we focus on some diseases for which treatment and/or prevention approaches include lifestyle changes.

A. Obesity

Obesity is characterized by the exacerbated accumulation of adipose tissue in the body in response to change in lifestyle and dietary habits (hypercaloric diets), and it is considered one of the higher-incidence, non-degenerative diseases of the 21st century.³⁴ Adipose tissue is composed not only of adipocytes but also of a stromal vascular fraction that contains preadipocytes, endothelial cells, fibroblasts, and immune cells.³⁵ With a higher caloric

intake and lower expenditure of energy (i.e., a sedentary lifestyle), the hypertrophy of adipose tissue is triggered.³⁶ This expansion of adipocytes also leads to a lack of oxygen in the adipose tissue (hypoxia) that stimulates chemotactic monocytes/macrophages and induces the overexpression of inflammatory cytokines, altering the homeostasis of the organism. In addition, an angiogenic event may favor the infiltration of immune cells in the tissue, an overproduction of extracellular matrix, and the exacerbated release of proinflammatory cytokines by infiltrated macrophages.³⁷

In adipose tissue hypertrophy, the recruitment of immune cells varies according to the stage and type of immune cells. In some studies, animal models fed with a high-fat diet have shown an increase in neutrophil numbers a few days after diet initiation.³⁸ Subsequently, the increase in the number of macrophages and natural killers (NK) seems to occur in the weeks after a high fat diet, especially the proliferation of tissue-resident populations.³⁹ In an attempt to better characterize the markers of this phenotypes, Cho et al. (2014)⁴⁰ observed that a high-fat diet (12 weeks) not only increased the quantity of adipose-tissue macrophage content but modified the distribution of M1 (CD11c+CD301-) and M2 (CD11c-CD301+) in visceral fat.

This local accumulation of immune cells is the threshold for inflammation and activation of the immune system. Nonetheless, the most important fact in the obesity-induced inflammation and consequent insulin resistance seems to be macrophage polarization to its pro-inflammatory state (M1).⁴¹

Under normal conditions, macrophages can be found in adipose tissue, and their function is to maintain the homeostasis of organic systems; however, monocytes are attracted to adipose tissue by the secretion of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) in an attempt to eliminate inflammation.

Higher levels of proinflammatory cytokines released by the immune cells can lead to inflammation and further insulin resistance.⁴² In agreement with this idea, a model of deletion of MCP-1 has indicated that there is protection from the insulin resistance induced by a high-fat diet as well as a reduction of the lipid content in the liver.⁴³ Indeed,

it is clear that there is cross talk between adipocytes and macrophages, starting with the exacerbated production of macrophage-derived TNF- α , which in turn acts on the TNF- α receptors of adipocytes and stimulates its lipolysis. Once the adipocytes release their contents of free fatty acids, which are potential Toll-like receptor 4 (TLR4) binders, and they consequently induce the NF- κ B inflammatory pathway (Figure 1).⁴ T lymphocytes are present throughout adipose tissue, facilitating the production of pro-inflammatory cytokines, or in other words, favoring local inflammation and also spreading it systemically.

This state of low-grade inflammation involves the classical macrophage phenotype. However, the signaling pathways work as inflammatory mediators and regulators of energy metabolism.⁴⁴ One of the first consequences of this hypertrophy and low-grade inflammation is insulin resistance in adipose tissue, caused by activation of c-jun-N-terminal kinase (JNK) and inhibitor of κ kinase (IKK), which is responsible for impairing insulin receptor phosphorylation.⁴⁵ As a result, an increase in the lipolysis of the adipose tissue, especially the visceral fat (which also increases the efflux of fat acids in the liver), also collaborated with the higher secretion of pro-inflammatory adipokines and reduces adiponectin, an anti-inflammatory marker.⁴⁶ The mechanisms underlying this lipolysis are not clear; however, the overexpression of proinflammatory cytokines may affect proteins related to lipid droplet stability, such as reduction of perilipin expression by TNF- α , which consequently facilitates the access of lipases to the triglyceride.⁴⁷

In macrophage polarization, the mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1), a nutrient/energy sensor able to regulate some metabolic processes, seems to play an important role. Moreover, elevated mTORC1 activity and consequent down-regulation of Akt signaling may facilitate increased responses to LPS stimulation of macrophages, particularly adipose tissue macrophages. Furthermore, the constitutive mTORC1 activity impairs M2 polarization by attenuation of AKT activation in IL-4-induced polarization.⁴⁸

B. Insulin Resistance

Primarily, insulin resistance is recognized as the impairment or inability of this hormone to allow glucose uptake into peripheral tissues.⁴⁹ Insulin action is mediated by a receptor on the membrane that triggers a cascade of interactions aimed at the translocation of the transporter to the membrane, which finally promotes the glucose uptake. The mechanisms possibly involved in the onset of insulin resistance are genetic abnormality in any proteins related to its cascade of activation, including fetal malnutrition and visceral adiposity.⁵⁰

The skeletal muscle is the major insulin-stimulated disposal of glucose in the body;⁵¹ however, the increase of fatty acid deposits in this tissue impairs the insulin sensitivity via recruitment of immune cells. In a recent study performed by Khan et al. (2015),⁵² macrophage and T-cell markers were upregulated in skeletal muscle of obese individuals compared with lean individuals. Additionally, in animal model of high fat diet, inflammatory cytokines had higher expression rate that was correlated with insulin resistance, as did macrophages and T cells localized in extramyocellular adipose tissue. This condition is also associated with MCP-1-mediated macrophage accumulation on skeletal muscle⁵³; however, insulin resistance is not an exclusive condition for obese subjects. Masharani et al. (2011)⁵⁴ observed that insulin resistance in healthy non-obese subjects was followed by an increased in insulin receptor-1 serine phosphorylation and JNK pathway activation. Furthermore, some studies have shown that HDL plays an important role on glucose metabolism.⁵⁵ In skeletal muscle, this lipoprotein was able to restore the impaired insulin-stimulated glucose uptake induced by lipid accumulation and macrophage recruitment.⁵⁶

In obesity, as mentioned above, macrophages are recruited to white adipose tissue by chemotaxis⁵⁷ or the resident cells proliferate in the tissue.¹¹ An animal study confirmed that overexpression of MCP-1 was associated with higher susceptibility to insulin resistance.⁵⁸ The liver is another organ that can develop insulin resistance; the related mechanisms are described later in the paper.

C. Atherosclerosis

Abnormalities in the plasmatic levels of lipoproteins of the general population are not rare. Accordingly, such abnormalities are the main reason for the development of atherosclerosis, a chronic inflammatory disease characterized by the formation of lipid plaques and fibrous tissue (atheromas) in the walls of arteries. Several aspects of the initial events of the pathology must be considered: the accumulation of LDL cholesterol in the subendothelial matrix, followed by preferred areas for lesion formation (arterial branching or curvature), hemodynamic strengthening of endothelial cells, and the presence of nitric oxide synthase (NOS), which influences the permeability of the vessels.⁵⁹ LDLs are lipoproteins that are also organized by apolipoprotein B (ApoB), a structure able to interact with matrix components and that contribute to atherogenesis. Native LDL by itself is not enough for macrophage signaling, so a modification in this lipoprotein is necessary.⁶⁰ In the case of atherosclerosis, oxidized LDL (oxLDL) is a consequence of exposure to ROS produced by endothelial cells and macrophages.⁵⁹ An inflammatory response is then initiated, caused by injury to the vascular endothelium, which expresses and secretes a series of molecules acting as immune system activators. Concurrently, oxLDL itself plays a role as a chemotactic factor for monocytes and adhesion molecules, increasing secretion of cytokines such as macrophage colony-stimulating factor (M-CSF).⁶¹ Thus begins the differentiation of monocytes into M1 macrophages that internalize oxLDL, followed by the formation of foam cells in a process mediated by a group of 'scavenger' receptors such as SR-A and CD36; this process seems to have primary importance and consequently initiates an immune-inflammatory response. Foam cells also produce TNF- α , inducing the formation of clots and acute coronary syndromes.⁶² NO production is inhibited by oxLDL, which enhances the vessel contraction resulting in higher blood pressure, an important risk factor for the development of atherosclerosis. On the other hand, HDL exerts a protective function by inhibiting LDL oxidation and/or removing the excess cholesterol from peripheral tissues.⁶³ The formation

of an atherosclerotic plaque is then initiated, which is composed of cellular elements, extracellular matrix components (fibrous cap) and a lipid core (cholesterol). Vulnerable plaques usually have a thinner fibrous cap and a necrotic core associated with hemorrhagic/thrombotic areas. Consequently, augmented biomarkers of plaque vulnerability such as pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL-6, IL-1), smooth muscle cells (Calponin-1), extracellular matrix integrity (PCPE-1), and oxidative stress (DJ-1). Malaud et al. (2014)⁶⁴ also used variations of plasma concentrations of local plaque biomarkers to diagnose this disease.

D. Nonalcoholic Steatohepatitis

First, it is important to clarify that nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a progression of the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), a disease characterized by the fat accumulation on hepatocytes without a history of alcohol consumption and accompanied by metabolic disorders.⁶⁵ Furthermore, the progression of the NAFLD can reach states of liver fibrosis or hepatocellular carcinoma.⁶⁶ The clinical diagnosis for this complication has been studied in an attempt to develop a non-invasive diagnosis method; the liver biopsy is considered the most accurate method.⁶⁷ Some studies have sought to elucidate biomarkers^{68,69} or body composition components⁷⁰ that predict the NAFLD.

It is well known that some metabolic disorders are associated with NAFLD, such as metabolic syndrome and chronic low-grade inflammation. In addition, its pathogenesis involves two hypotheses: one regards the fat accumulation and insulin resistance on hepatocyte, the other considers oxidative stress and cytokines in the inflammation.⁷¹ The liver has a dual blood supply (hepatic artery and portal vein), which justifies the presence of a variety of immune innate cells in this tissue, such as Kupffer cells (resident macrophages), dendritic cells, natural killer cells, and T cells.⁷² Kupffer cells represent 80%–90% of all the macrophages in the body,⁷³ and they are able to phagocytize and release proinflammatory cytokines and chemokines in the presence of pathogens. On the other hand, these cells can also

cooperate to alleviate tissue damage in some infections and/or inflammatory diseases.⁷⁴ Additionally, the innate immune system can stimulate cells from the adaptive immune system (antigen-specific T and B lymphocytes) and can promote their differentiation and proliferation.⁷⁵ Studies in human and animal models have shown the importance of Kupffer cells on the onset and development of NAFLD.⁷⁶ These cells are activated by several mechanisms including pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage endogenous-associated molecular patterns (DAMPs). The first is related to dysbiosis, in which the gut microbiome is modified, and in obesity, in which gut-derived bacterial translocation is increased. The second condition is associated to the progression of disease and the presence of endogenous molecules released by adjacent damaged hepatocytes via activation of TLRs of the macrophages or Kupffer cells.⁷⁷ Furthermore, obesity is associated with an infiltration of a population of hepatic macrophages, which is triggered by Kupffer cells (resident macrophages). Thus, infiltrated macrophages seem to be the major cause of the inflammatory state in the livers of high-fat-diet mice. Moreover, factors secreted from these cells appear to contribute to hepatic insulin resistance, whereas Kupffer cell-derived factors do not.⁷⁸

IV. EXERCISE AND THE IMMUNE SYSTEM

The immune system is responsible for protecting an organism from stress agents, whether by injury from invasion by pathogens (infection) or by tissue injury (inflammation), as in physical exercise, which may alter body homeostasis and immune cells composing an efficient line of defense. Exercise, both bouts and training, acts as a significant stressor during and after its performance, and exercise is able to change the behavior of immune cells as they relate to hormonal, mechanical, and metabolic alterations.

One of the earliest studies that found interaction between the immune system and exercise was conducted by Bjorn Ahlborg and Gunvor Ahlborg in 1970.⁷⁹ They observed that during exercise there was a significant increase in the plasmatic concentration of immune cells (leucocytosis) in response

to adrenergic activity. Muscle activity also leads to an immunological modulation that increases the number of immune cells, particularly neutrophils, given that these are the most abundant immune cells in the blood and have the ability to neutralize an acute inflammatory response,⁸⁰ together with macrophages.⁸¹ Immune system cells, particularly lymphocytes, monocytes and macrophages, are able to produce signaling proteins or immune-modulator biomarkers, termed cytokines, with paracrine, autocrine, and endocrine functions. A unique cytokine may play different roles in various tissues, cells, and organs depending on the stimulus.⁸²

Notably, the behavior of the immune system in response to the exercise intervention depends directly on such variables of training as duration, intensity, and type of exercise. Studies dating from the end of the 1990s have reported considerable differences in response to intense stimulus, which is responsible for an increased risk of upper respiratory tract infections. Additionally, in a theory confirmed some years later by Nieman (1994),⁸³ long-term exercise practiced moderately has a protective effect against the risk of infection and, therefore, is beneficial to health. In the case of long-term intense exercise, a short period of immunosuppression (3 and 72 hours) occurs mainly due to high rates of stress hormones that are circulating in the bloodstream. However, individuals who exercise regularly at moderate intensity exhibit lower risk of infection. This adaptation to training has one of its explanations in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and is explained by the presence of receptors for stress hormones in immune cells.⁸⁴

Researchers have tried to understand more deeply the mechanisms that modulate these immune responses to exercise. Thus, there has been a considerable increase in the number of studies in this field. It is currently known that both cellular and humoral components (antibodies, complement proteins, and antimicrobial peptides) are recruited in the innate and adaptive immune system in an attempt to return to the initial homeostasis. According to Costa Rosa (2004),⁸⁵ there is an interaction between the psychoneuroimmunoenocrine axis and the skeletal muscle, and glutamine produced by skeletal muscle is essential to

immune cells even in a quiescent state. In addition, mechanical stimulation is associated with skeletal muscle damage (fatiguing exercise protocol), as is the recruitment of immune cells via interaction of neutrophil and endothelial cells mediated by ROS.⁸⁶

Moderate exercise was able to increase the cytotoxic activity and the phagocytic capacity of peritoneal macrophage adhesion.⁸⁷ This hypothesis was confirmed by Silveira et al. (2007)⁸⁸ in an acute swimming session (1 h) performed with sedentary rats, which resulted in a 2.4-fold increase in macrophage phagocytic capacity as well as in an oxidative burst and in the production of nitric oxide by macrophages. In response to acute aerobic exercise, normal subjects and obese, non-diabetic subjects had an increase in skeletal muscle cytokine expression (MCP1 and IL-6) as well as activation of the NF- κ B pathway.⁸⁹ In turn, the pro-inflammatory pathway results in NF κ B-activated production of cytokines such as TNF- α by macrophages, which consequently act in an autocrine manner by enhancing the activation of these immune system cells. Cortisol, which is produced by the adrenal gland within the adrenal cortex in response to stress and the low blood glucose caused by exercise, induces the secretion of IL-6 and IL-10 by macrophages, which may block NF- κ B activation in an autocrine fashion.⁸⁸

Specific metabolic and hormonal alterations occur during exercises in which oxygen consumption is $\geq 60\%$,^{90,91} which is typical consumption of long-term aerobic exercise. There is a significant increase in plasmatic concentrations of cortisol to stimulate gluconeogenesis, by not glycidyl compounds such as amino acids. They promote protein catabolism from tissue repair and, consequently, maintain activity. Changes in this catabolic hormone are directly related to glucose concentration in the blood, verifying an inverse relationship between these variables. Glutamine is an amino acid released in catabolism from the increase in cortisol concentration. It may be used in several tissues during exercise⁹² and is an energy source for skeletal muscle.⁹³ However, this amino acid is also an important substrate for maintaining immune cell activity, especially of macrophages and lymphocytes. Therefore, glutamine reduction in the bloodstream promotes a reduction in macrophage

function, apoptosis, and an increase in production and release of pro-inflammatory cytokines, as TNF- α and IL-1 β , which favors the installation of an immunosuppressive profile.⁹⁴

V. EXERCISE AND MACROPHAGE POLARIZATION

Two lines of studies are emerging with regard to exercise and macrophage polarization; one is related to macrophage polarization associated with adipose tissue and metabolic syndrome⁹⁵ and the other regards the association with skeletal muscles damage and regenerative process.⁹⁶ The anti-inflammatory and anti-atherogenic role of physical exercise, when practiced regularly, is well known to directly affect the production of anti-inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-10, IL-18, and IL-1ra, and to yield improvements in substrate uptake and changes in amounts and phenotype of monocytes and macrophages. Below, we summarize studies that demonstrate the anti-inflammatory effects of exercise through the polarization of macrophages given different exercise protocols in human and animal models.

A. Human Model

There are some inconsistencies in data about human and rodent models with regard to recruitment of leucocytes in skeletal muscles after acute exercise; 80% of the rodent models observed some recruitment and infiltration versus 55% in humans.⁹⁷ This fact becomes even more complicated when the object of the study is macrophage polarization.⁹⁶ Macrophage recruitment and polarization seems to be associated to a large extent with muscle damage and appears to be limited only in subjects that perform *uncustomized* types of muscle contraction.⁹⁸

However, in a study conducted by Gordon et al. (2012)⁹⁹ with 7 healthy subjects investigated the effect of strength training on the immune activation in skeletal muscle in response to an acute exercise session. This session comprised five upper arm exercises [biceps preacher curl, biceps concentration curl, standing biceps curl, overhead triceps extension,

triceps kickback] with three sets of six reps using the six repetition maximum (RM) weight and resting for 2 min between sets. After exercise, a reduction in monocyte chemoattraction in trained compared with untrained muscle was observed, as well as a persistent decrease in pro-inflammatory macrophage subtype M1. An increase in anti-inflammatory macrophage subtype M2 in the trained compared with untrained muscle across two exercise conditions (bilateral and unilateral arm) was also observed. Additionally, expression of the M1 gene FCGR3B (CD16b) decreased in trained muscle compared with either exercised (2.14-fold) or non-exercised (2.97-fold) untrained muscle. On the other hand, expression of the M2 genes CD163 and MRC1 (CD206) increased in the trained muscle compared with either exercised (1.61- and 1.67-fold, respectively) or non-exercised (1.22- and 1.20-fold, respectively) untrained muscle. These results suggest the potential of strength exercise training on M1 reduction and augmentation of M2 polarization of macrophages (Table 1).

A study corroborating the above findings by Fink et al. (2013)¹⁰⁰ verified that the gene expression of MRC1 (mannose receptor C type 1), MGL (macrophage galactose-binding lectin), and CD163, which are anti-inflammatory M2 markers, were correlated with a high glucose disposal rate and were strongly correlated with muscle insulin sensitivity in exercised people with a BMI >25 kg/m². In this study, 15 overweight/obese subjects performed exercise interventions over 12 months. These interventions were characterized by 60 minutes of aerobic exercise (20 min warm-up and cool down, 20 min of running or cycling and 20 min of strength training) twice weekly, plus 60 min of swimming once weekly (Table 1). This training model suggests that the phenotype of muscle-resident macrophages and/or of a recruited population may be impacted by exercise intervention.

On the other hand, aerobic exercise, regardless of intensity, is also able to contribute positively to macrophage polarization, and consequently, also induces the anti-inflammatory response in this exercise model. Yakeu et al. (2010)¹⁰¹ observed that 8 weeks of low-intensity exercise intervention in sedentary individuals (walking 10,000 steps/day;

3 times per week) promoted upregulation of M2 markers (AMAC1, CD14, MR and IL-4), PGC-1 (α and β) and downregulation of M1 markers (MCP-1, TNF- α and IL-6) (Table 1). In addition, plasmatic concentrations of Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) increased after exercise, while those of Th1 cytokines (IL-6) decreased, suggesting that aerobic exercise at low intensity induces PPAR γ /PGC-1 activation, and consequently, M2 polarization. In response to physical exercise, PPAR may be activated by AMP-activated protein kinase (AMPK), a protein complex responsible for increasing lipid oxidation. Activated PPAR then stimulates the gene expression of lipolytic proteins and reducing the expression of lipogenic genes, via PPAR, and is able to regulate upstream factors associated with PPAR activity, such as PGC-1 α .

In a study conducted by Norrbom et al. (2011)¹⁰² to investigate the expression of PGC-1 splice variants in human skeletal muscle and the possible influence of metabolic perturbation (blood flow restriction) in response to a single one-legged knee extension exercise (the exercise session consisted of 45 min of restricted blood flow to the working leg, followed by 45 min with normal blood flow to the other leg) verified that the canonical promoter (PGC-1 α -a) and the alternative promoter upstream of the canonical promoter (PGC-1 α -b) were upregulated after the exercise session in the leg with blood-flow restriction. However, the fold change increase of PGC-1 α -b was much greater than that of PGC-1 α -a, and this condition demonstrated higher AMPK phosphorylation. In myoblasts cultured from the sample biopsies, a single bout of exercise upregulated PGC-1 in both promoter types. AMPK is a major regulator of this transcription factor from the canonical promoter and involves β -adrenergic (AICAR combined with norepinephrine) stimulation in combination with AMPK in the regulation of PGC-1 α -b. Another study by Bartlett et al. (2012)¹⁰³ was conducted with 10 active men performing acute sessions of high-intensity training on treadmills (7 min warm up at 70% $\text{VO}_{2\text{max}}$ and 6 bouts of 3 min at 90% $\text{VO}_{2\text{max}}$ with 3 min of active recovery at 50% $\text{VO}_{2\text{max}}$) and continuous training (50 min of continuous running at 70% $\text{VO}_{2\text{max}}$). The results demonstrated that both acute and long-term

TABLE 1: Exercise-induced alterations on markers related to macrophage polarization

	Author (year)	Sample	Exercise protocol	Results
Human	Gordon et al. (2012) ⁹⁹	Young healthy individuals (N=7)	12-wk progressive unilateral arm resistance exercise training program. Acute bout of bilateral RE in which the trained and the untrained arm exercised at the same relative intensity	↓ chemoattraction, ↓M1, ↑M2
	Fink et al. (2013) ¹⁰⁰	Normal weight and overweight/ Obese individuals (N=15)	(20 min warm-up and cool down, 20 min running or cycling and 20 min resistance training) plus 60 min swimming once weekly	↑ gene expression CD206, MGL, CD163
	Yakeu et al. (2010) ¹⁰¹	Sedentary individuals (N=17)	8-wk low-intensity exercise intervention (walking 10,000 steps/day; 3 times/week)	↑ M2 markers (AMAC1, CD14, MR and IL-4), PGC-1 (α and β)
	Bartlett et al. (2012) ¹⁰³	Active men (N=10)	Acute session - high intensity training (7 min warm-up at 70% $\text{VO}_{2\text{max}}$ and six bouts of 3 min at 90% $\text{VO}_{2\text{max}}$ with 3 min active recovery at 50% $\text{VO}_{2\text{max}}$) Continuous training - (50 min continuous running at 70% $\text{VO}_{2\text{max}}$)	↑ AMPK and p38mapk phosphorylation ↑ PGC-1 α mRNA
	Thomas et al. (2011) ¹¹⁸	Healthy, active, untrained Individuals (N=9)	Single 45-min bout of exercise at 70% $\text{VO}_{2\text{max}}$	↑ CD36 mRNA ↑ ABCA1 mRNA
		Healthy, active, untrained individuals (N=8)	8-wk training program designed to be progressive for training volume	↑ CD36 (protein)
Mouse	Chen et al. (2010) ¹¹⁶	Male C57BL/6 mice	8-wk training at 60% $\text{VO}_{2\text{max}}$, 5 days/week	↑ MKP-1
	Kawanishi et al. (2010) ⁹⁵	Male C57BL/6 mice	16-wk of 60 min/day at running speeds of 12–20 m/min, 5 times/week	↓ F4/80 ↑ CD163 adipose tissue ↓ CD11c, TNF- α and TLR4

M1, macrophages classically activated; M2, macrophages alternatively activated; CD206, cluster of differentiation 206; MGL, macrophage galactose-binding lectin; CD163, cluster of differentiation 163; MKP-1, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1; F4/80, marker of murine macrophage populations; CD11c, cluster of differentiation 11c; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; TLR4, Toll like receptor 4; AMAC1, alternative macrophage activation-associated CC chemokine-1; CD14, cluster of differentiation 14; MR, mannose receptor; IL-4, interleukin 4; PGC-1 (α and β), peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1- α and - β ; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase.

exercise (when matched for average intensity, duration, and work done) induced comparable increases in AMPK and p38MAPK phosphorylation as well as PGC-1 α mRNA content in human skeletal muscle (Table 1). These later studies suggest that in several models of training, and generally in the aerobic model provided, AMPK activation occurs that may act directly or indirectly as an alternative pathway for PPAR activation, given that PGC1- α is a known PPAR- γ ligand. In a recent study based on dietary antioxidant supplementation, Davies et al. (2015)¹⁰⁴ suggested that, in monocytes, the effect mediated by exercise on PPAR γ signaling increases the generation of PPAR γ ligands via oxidation of lipoproteins rather than via ROS-mediated AMPK activation.

Finally, it is well known that, in skeletal muscles, exercise is able to upregulate genes related to PPAR- γ and results in mitochondrial biogenesis and aerobic respiration,¹⁰⁵ whereas macrophage polarization of the M2 profile mediated by exercise is linked to PPAR activation in monocytes and is also associated with the anti-inflammatory effects of exercise.³³ Recently, studies have been conducted to elucidate the mechanisms by which exercise can modulate transcriptional activity of PPAR- γ on monocytes/macrophages as well as how exercise induces alterations in its pathway. Exercise intensity and duration have been shown to provide different results in modulating transcriptional activity in humans.

B. Animal Model

In rodents, the effect of acute exercise and macrophage polarization in skeletal muscle was already evident in different models of exercise and different types of muscle fiber.^{86,106} In soleus muscle (predominantly oxidative fiber), Tsivite et al. (2003)¹⁰⁷ observed elevation of ED1⁺ macrophages 24 hours after downhill exercise, but this elevation was not preceded by ED2⁺ macrophages. Additionally, he justified this result by absence of severe injuries induced in this muscle. In contrast, in triceps long head (predominantly glycolytic) fibers, Minari et al. (2015),¹⁰⁸ using the same downhill protocol in rats, observed higher levels of mRNA gene expression CD163 after 48 hours, which indicates that

macrophage polarization occurred in this muscle tissue. However, in protocols where muscle damage is deeper, macrophage polarization was more pronounced, such as in passive stretches¹⁰⁹ and lengthening contractions.¹¹⁰ Unfortunately, none of these studies evaluated the influence of metabolism associated with M2 elevation or whether the macrophage polarization was influenced by differences in the type of muscle fiber.

Training protocols based on aerobic exercises are the most frequently featured in scientific studies using animal models, and this training model, acutely or chronically, is able to induce phenotypic switching from M1 macrophage to M2 macrophage in obese adipose tissue in addition to inhibiting M1 macrophage infiltration into adipose tissue.^{95,111} In an animal model of regular physical activity, mRNA expression of β 2 and β 3-adrenergic receptor on retroperitoneal adipose tissue increased compared with the sedentary group,¹¹² supporting the increased sensitivity of adipose tissue to lipolysis by exercise. Paradoxically, one adaptation, as a result of physical training (18 m/min, 30 min/day, 5 days/week for 3 weeks), may be the attenuation of sympathoadrenomedullary activity, explained by the reduction in β 2-adrenergic receptors in macrophages. Its receptor plays an important role in the immune system, and some studies have shown an enhancement of bactericidal activity in β 2-adrenergic receptor-dependent and β 2-adrenergic receptor-independent macrophages. In addition, this receptor may also influence NK- κ B activation by β -arrestin-2 through desensitization of G protein-coupled receptor in macrophages.¹¹³ Research from 1997 suggests the inhibition of NK- κ B due to cAMP and PKA activation and consequent phosphorylation of CREB (cAMP responsive element binding).¹¹⁴ Additionally, the activation of the β -adrenergic receptors can stimulate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade in a Gs-dependent or a Gs-independent way. Previous studies have shown that the mechanism whereby β -adrenergic receptor activation upregulates proinflammatory cytokines production involves neither PKA nor NF- κ B. Nonetheless, this production is mediated through the stimulation of ERK1/2 and p38 MAPK.¹¹⁵

MAPK plays an important role in the produc-

tion of proinflammatory cytokines, whereas MAPK phosphatase-1 (MKP-1) negatively regulates macrophage MAPK activation. Chen et al. (2010)¹¹⁶ in his study conducted with a 7-week-old male C57BL/6 (8 weeks of training at 60% of maximum oxygen consumption, 5 days/week) observed that the mRNA level of MKP-1 in peritoneal macrophages increased in the training group, whereas stimulation with LPS (100 ng·mL⁻¹) elevated MKP-1 protein expressions and attenuated levels of IL-6, TNF- α , and MCP-1. It also reduced the activity of p38 MAPK, whose prolonged activation led to proinflammatory cytokines when stimulated by LPS (Table 1).¹¹⁷

Furthermore, chronic exercise training (60 min/day at running speeds of 12–20 m/min 5 times/week for 16 weeks) seems to inhibit macrophage infiltration into adipose tissue, thus attenuating the expression of F4/80 mRNA in this tissue. Furthermore, exercise training may also increase expression of M2 markers (CD163), decrease CD11c (M1 marker), and reduce TNF- α and TLR4 mRNA expression, which activates the inflammatory pathway of NF- κ B (Table 1).⁹⁵

Interestingly, most recent studies that demonstrate evidence of the effectiveness of physical exercise training in M1 to M2 macrophage plasticity and anti-inflammatory responses, whether in animal or human studies, are conducted mainly using aerobic exercise, whereas studies using isolated strength exercise are less abundant. However, the use of models through the training of aerobic exercise can be explained by the activation of PPAR, which may be a key protein complex.

VI. CONCLUSION

Understanding the mechanisms by which a unique cell of the immune system is able to control or change its metabolism to combat an inflammatory response may be the key for the attenuation of metabolic disorders. Prevention and treatment are always focused on the modifications of metabolic status provided by exercise, acute or long-term, moderate or vigorous. Most exercise seems to be relevant for beneficial metabolic modifications and improvements to health through the modulation of macrophage plasticity.

ACKNOWLEDGMENTS

Loreana Sanches Silveira thanks FAPESP for financial support (grant no. 2014/01246-6); Barbara de Moura Mello Antunes thanks FAPESP for financial support (grant no. 2014/08003-1); José Cesar Rosa Neto thanks FAPESP for financial support (grant no. 2013/09367-4); and Fabio Santos Lira thanks FAPESP for financial support (grant no. 2013/25310-2).

REFERENCES

1. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860–7.
2. Mul JD, Stanford KI, Hirshman MF, Goodyear LJ. Exercise and regulation of carbohydrate metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;135:17–37.
3. Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:275–97.
4. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 2010;88(1):33–9.
5. Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. *Essays Biochem*. 2006;42:105–17.
6. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:219–46.
7. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23–35.
8. Biegans V, Rensen PC, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R. NASH and atherosclerosis are two aspects of a shared disease: central role for macrophages. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):287–93.
9. Jakicic JM, King WC, Marcus MD, Davis KK, Helsel D, Rickman AD, Gibbs BB, Rogers RJ, Wahed A, Belle SH. Short-term weight loss with diet and physical activity in young adults: The IDEA study. *Obesity (Silver Spring)*. 2015.
10. Hirsch JG. Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff. *Bacteriol Rev*. 1959;23(2):48–60.
11. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells.

- Science. 2012;336(6077):86–90.
12. Douglas SD, Musson RA. Phagocytic defects-monocytes/macrophages. *Clin Immunol Immunopathol.* 1986;40(1):62–8.
13. Guillemin GJ, Brew BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol.* 2004;75(3):388–97.
14. Woods J, Lu Q, Ceddia MA, Lowder T. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(5):545–53.
15. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med.* 1998;187(12):2103–8.
16. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
17. Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol.* 2012;189(7):3669–80.
18. Galvan-Pena S, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol.* 2014;5:420.
19. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology.* 2008;8(12):958–69.
20. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity.* 28(4):477–87.
21. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677–86.
22. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):750–61.
23. Crespo A, Filla MB, Murphy WJ. Low responsiveness to IFN-gamma, after pretreatment of mouse macrophages with lipopolysaccharides, develops via diverse regulatory pathways. *Eur J Immunol.* 2002;32(3):710–9.
24. Italiani P, Boraschi D. New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory. *Immune Netw.* 2015;15(4):167–76.
25. Wensveen FM, Valentini S, Sestan M, Turk Wensveen T, Polic B. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *Eur J Immunol.* 2015;45(9):2446–56.
26. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes.* 2007;56(1):16–23.
27. Mansour M. The roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the metabolic syndrome. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;121:217–66.
28. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frerig V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes.* 1997;46(8):1319–27.
29. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999;20(5):649–88.
30. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res.* 2005;51(2):85–94.
31. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2007;28(12):551–8.
32. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red Eagle A, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature.* 2007;447(7148):1116–20.
33. Boulhel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARγ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metabolism.* 6(2):137–43.
34. Haidar YM, Cosman BC. Obesity epidemiology. *Clin Colon Rectal Surg.* 2011;24(4):205–10.
35. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85–97.
36. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne).*

- 2013;4:52.
37. Lumeng CN. Innate immune activation in obesity. *Mol Aspects Med.* 2013;34(1):12–29.
 38. Talukdar S, Oh daY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofrecio J, Lin M, Brenner MB, Olefsky JM. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med.* 2012;18(9):1407–12.
 39. Amano SU, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, Nicoloso SM, Yaw JC, Shen Y, Czech MP, Aouadi M. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* 2014;19(1):162–71.
 40. Cho KW, Morris DL, Lumeng CN. Flow cytometry analyses of adipose tissue macrophages. *Methods Enzymol.* 2014;537:297–314.
 41. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175–84.
 42. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(3):446–62.
 43. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K-i, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of Clinical Investigation.* 2006;116(6):1494–505.
 44. Claria J, Gonzalez-Periz A, Lopez-Vicario C, Rius B, Titos E. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators. *Front Immunol.* 2011;2:49.
 45. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem.* 2000;275(12):9047–54.
 46. Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005;2(1):46–53.
 47. Bezire V, Mairal A, Anesia R, Lefort C, Langin D. Chronic TNFalpha and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis. *FEBS Lett.* 2009;583(18):3045–9.
 48. Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, Horng T. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun.* 2013;4:2834.
 49. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1821–30.
 50. Lebovitz HE. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109 Suppl 2:S135–48.
 51. Thiebaud D, Jacot E, DeFronzo RA, Maeder E, Jequier E, Felber JP. The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man. *Diabetes.* 1982;31(11):957–63.
 52. Khan IM, Perrard XY, Brunner G, Lui H, Sparks LM, Smith SR, Wang X, Shi ZZ, Lewis DE, Wu H, Ballantyne CM. Intermuscular and perimuscular fat expansion in obesity correlates with skeletal muscle T cell and macrophage infiltration and insulin resistance. *Int J Obes (Lond).* 2015.
 53. Patsouris D, Cao JJ, Vial G, Bravard A, Lefai E, Durand A, Durand C, Chauvin MA, Langerette F, Debarb C, Michalski MC, Laville M, Vidal H, Rieusset J. Insulin resistance is associated with MCP1-mediated macrophage accumulation in skeletal muscle in mice and humans. *PLoS One.* 2014;9(10):e110653.
 54. Masharani UB, Maddux BA, Li X, Sakkas GK, Mulligan K, Schambelan M, Goldfine ID, Youngren JF. Insulin resistance in non-obese subjects is associated with activation of the JNK pathway and impaired insulin signaling in skeletal muscle. *PLoS One.* 2011;6(5):e19878.
 55. Drew BG, Rye KA, Duffy SJ, Barter P, Kingwell BA. The emerging role of HDL in glucose metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(4):237–45.
 56. Carey AL, Siebel AL, Reddy-Luthmoodoo M, Natoli AK, D'Souza W, Meikle PJ, Sviridov D, Drew BG, Kingwell BA. Skeletal muscle insulin resistance associated with cholesterol-induced activation of macrophages is prevented by high density lipoprotein. *PLoS One.* 2013;8(2):e56601.
 57. Herishanu Y, Rogowski O, Polliack A, Marilus R. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. *Eur J Haematol.* 2006;76(6):516–20.
 58. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kawatari N, Kumagai K,

- Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2006;281(36):26602–14.
59. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233–41.
60. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991;88(6):1785–92.
61. Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, Muragaki Y. Diverse Roles of Macrophages in Atherosclerosis: From Inflammatory Biology to Biomarker Discovery. *Mediators of Inflammation*. 2012;2012:14.
62. Petersen JW, Felker GM. Inflammatory biomarkers in heart failure. *Congest Heart Fail*. 2006;12(6):324–8.
63. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fogelman AM. Mechanisms of Disease: proatherogenic HDL[mdash]an evolving field. *Nat Clin Pract End Met*. 2006;2(9):504–11.
64. Malaud E, Merle D, Piquer D, Molina L, Salvétat N, Rubrecht L, Dupaty E, Galea P, Cobo S, Blanc A, Saussine M, Marty-Ane C, Albat B, Meilhac O, Rieunier F, Pouzet A, Molina F, Laune D, Fareh J. Local carotid atherosclerotic plaque proteins for the identification of circulating biomarkers in coronary patients. *Atherosclerosis*. 2014;233(2):551–8.
65. Gerhard GS, DiStefano JK. Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2015;7(2):226–34.
66. Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology*. 2010;51(5):1820–32.
67. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005–23.
68. Lakshman R, Shah R, Reyes-Gordillo K, Varatharajulu R. Synergy between NAFLD and AFLD and potential biomarkers. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39 Suppl 1:S29–34.
69. Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Tomeno W, Shinohara Y, Kato S, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Kirikoshi H, Maeda S, Saito S, Wada K, Nakajima A. Soluble CD14 levels reflect liver inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013;8(6):e65211.
70. Silveira LS, Monteiro PA, Antunes Bde M, Seraphim PM, Fernandes RA, Christofaro DG, Freitas Junior IF. Intra-abdominal fat is related to metabolic syndrome and non-alcoholic fat liver disease in obese youth. *BMC Pediatr*. 2013;13:115.
71. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842–5.
72. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. 2008;47(2):729–36.
73. Gregory SH, Wing EJ. Neutrophil-Kupffer-cell interaction in host defenses to systemic infections. *Immunol Today*. 1998;19(11):507–10.
74. Shi C, Paner EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762–74.
75. Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:949157.
76. Lanthier N. Targeting Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why and how? *World J Hepatol*. 2015;7(19):2184–8.
77. Ganz M, Szabo G. Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatol Int*. 2013;7 Suppl 2:771–81.
78. Morinaga H, Mayoral R, Heinrichsdorff J, Osborn O, Franck N, Hah N, Walenta E, Bandyopadhyay G, Pessentheiner AR, Chi TJ, Chung H, Bogner-Strauss JG, Evans RM, Olefsky JM, Oh da Y. Characterization of distinct subpopulations of hepatic macrophages in HFD/obese mice. *Diabetes*. 2015;64(4):1120–30.
79. Ahlborg B, Ahlborg G. Exercise leukocytosis with and without beta-adrenergic blockade. *Acta Med Scand*. 1970;187(4):241–6.
80. Lockhart NC, Brooks SV. Neutrophil accumulation following passive stretches contributes to adaptations that reduce contraction-induced skeletal muscle injury in mice. *J Appl Physiol* (1985). 2008;104(4):1109–15.
81. Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue

- damage and repair. *J Athl Train.* 2006;41(4):457–65.
82. Lacy P, Stow JL. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. 2011-07-07 00:00:00. 9–18 p.
 83. Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, editors. *The immune response to exercise. Seminars in hematology*; 1994.
 84. Nieman D. Marathon Training and Immune Function. *Sports Medicine.* 2007;37(4–5):412–5.
 85. Costa Rosa LF. Exercise as a time-conditioning effector in chronic disease: a complementary treatment strategy. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2004;1(1):63–70.
 86. Nunes-Silva A, Bernardes PT, Rezende BM, Lopes F, Gomes EC, Marques PE, Lima PM, Coimbra CC, Menezes GB, Teixeira MM, Pinho V. Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study. *PLoS One.* 2014;9(5):e96464.
 87. Woods JA, Davis JM, Mayer EP, Ghaffar A, Pate RR. Effects of exercise on macrophage activation for antitumor cytotoxicity. *J Appl Physiol* (1985). 1994;76(5):2177–85.
 88. Silveira EMS, Rodrigues MF, Krause MS, Vianna DR, Almeida BS, Rossato JS, Oliveira LP, Curi R, de Bittencourt PIH. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF- κ B pathways. *Cell Biochemistry and Function.* 2007;25(1):63–73.
 89. Tantiwong P, Shanmugasundaram K, Monroy A, Ghosh S, Li M, DeFronzo RA, Cersosimo E, Sriwijitkamol A, Mohan S, Musi N. NF-kappaB activity in muscle from obese and type 2 diabetic subjects under basal and exercise-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(5):E794–801.
 90. Viru A. Mechanism of general adaptation. *Med Hypotheses.* 1992;38(4):296–300.
 91. Hackney AC. The male reproductive system and endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1996;28(2):180–9.
 92. Neto JC, Lira FS, de Mello MT, Santos RV. Importance of exercise immunology in health promotion. *Amino Acids.* 2011;41(5):1165–72.
 93. Pedersen BK, Rohde T, Ostrowski K. Recovery of the immune system after exercise. *Acta Physiol Scand.* 1998;162(3):325–32.
 94. dos Santos RV, Caperuto EC, de Mello MT, Costa Rosa LF. Effect of exercise on glutamine metabolism in macrophages of trained rats. *Eur J Appl Physiol.* 2009;107(3):309–15.
 95. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev.* 2010;16:105–18.
 96. Chazaud B. Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling-application to exercise-induced muscle damage management. *Immunol Cell Biol.* 2015.
 97. Schneider BS, Tiidus PM. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med.* 2007;37(10):837–56.
 98. Paulsen G, Crameri R, Benestad HB, Fjeld JG, Morkrid L, Hallen J, Raastad T. Time course of leukocyte accumulation in human muscle after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(1):75–85.
 99. Gordon PM, Liu D, Sartor MA, Iglay Reger HB, Pistilli EE, Gutmann L, Nader GA, Hoffman EP. Resistance exercise training influences skeletal muscle immune activation: a microarray analysis. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(3):443–53.
 100. Fink LN, Oberbach A, Costford SR, Chan KL, Sams A, Bluhm M, Klip A. Expression of anti-inflammatory macrophage genes within skeletal muscle correlates with insulin sensitivity in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2013;56(7):1623–8.
 101. Yakeu G, Butcher L, Isa S, Webb R, Roberts AW, Thomas AW, Backx K, James PE, Morris K. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPARgamma and Th2 cytokines. *Atherosclerosis.* 2010;212(2):668–73.
 102. Norrbom J, Sallstedt EK, Fischer H, Sundberg CJ, Rundqvist H, Gustafsson T. Alternative splice variant PGC-1alpha-b is strongly induced by exercise in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(6):E1092–8.
 103. Bartlett JD, Hwa Joo C, Jeong TS, Louhelainen J, Cochran AJ, Gibala MJ, Gregson W, Close GL, Drust B, Morton JP. Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1alpha mRNA, AMPK, p38, and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. *J*

- Appl Physiol (1985). 2012;112(7):1135–43.
104. Davies NA, Watkeys L, Butcher L, Potter S, Hughes MG, Moir H, Morris K, Thomas AW, Webb R. The contributions of oxidative stress, oxidised lipoproteins and AMPK towards exercise-associated PPARgamma signalling within human monocytic cells. *Free Radic Res*. 2015;49(1):45–56.
 105. Gibala MJ, McGee SL, Gamham AP, Howlett KF, Snow RJ, Hargreaves M. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1alpha in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2009;106(3):929–34.
 106. McLoughlin TJ, Mylona E, Hornberger TA, Esser KA, Pizza FX. Inflammatory cells in rat skeletal muscle are elevated after electrically stimulated contractions. *J Appl Physiol* (1985). 2003;94(3):876–82.
 107. Tsivitsis SK, McLoughlin TJ, Peterson JM, Mylona E, McGregor SJ, Pizza FX. Downhill running in rats: influence on neutrophils, macrophages, and MyoD+ cells in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*. 2003;90(5–6):633–8.
 108. Minari AL, Oyama LM, Dos Santos RV. Downhill exercise-induced changes in gene expression related with macrophage polarization and myogenic cells in the triceps long head of rats. *Inflammation*. 2015;38(1):209–17.
 109. Pizza FX, Koh TJ, McGregor SJ, Brooks SV. Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol* (1985). 2002;92(5):1873–8.
 110. Lapointe BM, Fremont P, Cote CH. Adaptation to lengthening contractions is independent of voluntary muscle recruitment but relies on inflammation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282(1):R323–9.
 111. Oliveira AG, Araujo TG, Carvalho BM, Guadagnini D, Rocha GZ, Bagarolli RA, Carvalheira JB, Saad MJ. Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats. *Obesity* (Silver Spring). 2013;21(12):2545–56.
 112. Jenkins NT, Padilla J, Rector RS, Laughlin MH. Influence of regular physical activity and caloric restriction on beta-adrenergic and natriuretic peptide receptor expression in retroperitoneal adipose tissue of OLETF rats. *Exp Physiol*. 2013;98(11):1576–84.
 113. Kizaki T, Takemasa T, Sakurai T, Izawa T, Hanawa T, Kamiya S, Haga S, Imaizumi K, Ohno H. Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;372(1):152–6.
 114. Parry GC, Mackman N. Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappaB-mediated transcription. *J Immunol*. 1997;159(11):5450–6.
 115. Tan KS, Nackley AG, Satterfield K, Maixner W, Diatchenko L, Flood PM. Beta2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF-kappaB-independent mechanisms. *Cell Signal*. 2007;19(2):251–60.
 116. Chen MF, Chen HI, Jen CJ. Exercise training upregulates macrophage MKP-1 and affects immune responses in mice. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(12):2173–9.
 117. Quante T, Ng YC, Ramsay EE, Henness S, Allen JC, Parmentier J, Ge Q, Ammit AJ. Corticosteroids reduce IL-6 in ASM cells via up-regulation of MKP-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39(2):208–17.
 118. Thomas AW, Davies NA, Moir H, Watkeys L, Ruffino JS, Isa SA, Butcher LR, Hughes MG, Morris K, Webb R. Exercise-associated generation of PPARgamma ligands activates PPARgamma signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(5):806–15.

9.4. Artigo original publicado na Journal of Cell Physiology

Received: 13 March 2018 | Accepted: 10 August 2018
DOI: 10.1002/jcp.27333

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

WILEY *Journal of Cell Physiology*

Exercise rescues the immune response fine-tuned impaired by peroxisome proliferator-activated receptors γ deletion in macrophages

Loreana Sanches Silveira^{1,2} | Helena Angélica Pereira Batatinha² | Angela Castoldi³ | Niels Olsen Saraiva Câmara³ | Willian T. Festuccia⁴ | Camila Oliveira Souza² | José Cesar Rosa Neto² | Fábio Santos Lira¹

¹Department of Physical Education, Exercise and Immunometabolism Research Group, Post-Graduation Program in Movement Sciences, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil

²Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

³Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence

José Cesar Rosa-Neto, Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), Av. Lineu Prestes, 1524-lab.435, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.
Email: josecesar23@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2014/01246-6, 2013/25310-2, 2016/01409-8

Abstract

Background: Exercise is a powerful tool for prevention and treatment of many conditions related to the cardiovascular system and also chronic low-grade inflammation. Peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) exerts an import role on the regulation of metabolic profile and subsequent inflammatory response, especially in macrophages.

Purpose: To investigate the effects of 8-week moderate-exercise training on metabolic and inflammatory parameters in mice with PPAR γ deficiency in myeloid cells.

Methods: Twelve-week old mice bearing PPAR γ deletion exclusively in myeloid cells (PPAR γ lox/lox Lys Cre^{-/-}, knockout [KO]) and littermate controls (PPAR γ lox/lox Lys Cre^{-/-}, wild type [WT]) were submitted to 8-week exercise training (treadmill running at moderate intensity, 5 days/week). Animals were evaluated for food intake, glucose homeostasis, serum metabolites, adipose tissue and peritoneal macrophage inflammation, and basal and stimulated cytokine secretion.

Results: Exercise protocol did not improve glucose metabolism or adiponectin concentrations in serum of KO mice. Moreover, the absence of PPAR γ in macrophages exacerbated the proinflammatory profile in sedentary mice. Peritoneal cultured cells had higher tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion in nonstimulated and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated conditions and higher Toll-4 receptor (TLR4) gene expression under LPS stimulus. Trained mice showed reduced TNF- α content in adipose tissue independently of the genotype. M2 polarization ability was impaired in KO peritoneal macrophages after exercise training, while adipose tissue-associated macrophages did not present any effect by PPAR γ ablation.

Conclusion: Overall, PPAR γ seems necessary to maintain macrophages appropriate response to inflammatory stimulus and macrophage polarization, affecting also whole body lipid metabolism and adiponectin profile. Exercise training showed as an efficient mechanism to restore the immune response impaired by PPAR γ deletion in macrophages.

KEYWORDS

cytokines, energetic metabolism, aerobic training, transcriptional factor

1 | INTRODUCTION

Regular practice of physical exercise has been shown to exert many beneficial effects in the prevention and treatment of metabolic diseases such as obesity, cardiovascular diseases, and type 2 diabetes (Denham, O'Brien, & Charchar, 2016). Although the mechanism underlying these beneficial effects are still not completely defined, recent evidence indicates that exercise may protect from those diseases by attenuating the chronic low-grade inflammation, which affects many important metabolic organs in those conditions (Petersen & Pedersen, 2005). Indeed, chronic moderate-intensity exercise was shown to improve innate immune system function (Chen, Chen, & Jen, 2010), enhancing macrophages phagocytic ability and influencing its peritoneal phenotype (Kizaki et al., 2008).

Macrophages change their polarization depending on their microenvironment. Classically activated M1 macrophages mainly rely on glycolytic metabolism, display antitumoridal and antibactericidal activities and enhanced secretion of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species. Alternatively activated M2 macrophages, on the other hand, feature oxidative metabolism predominantly and are involved in tissue remodeling and immunomodulatory function (Tugal, Liao, & Jain, 2013). Previous studies have found that peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ), a nuclear receptor mainly expressed in adipocytes and macrophages (Lehrke & Lazar, 2005), is an important transcriptional factor involved in the determination of macrophage metabolism and function (Tugal et al., 2013). Indeed, PPAR γ , an important regulator of lipid metabolism that exerts anti-inflammatory actions by transrepressing the nuclear factor κ B (NF- κ B; Rao & Lokesh, 2016), has been reported in macrophages to induce mitochondrial biogenesis and expression of genes involved in oxidative metabolism leading to alternative M2 polarization (Odegaard et al., 2007). In addition, macrophages lacking PPAR γ showed prolonged inflammation and a delay in the healing process (Mirza et al., 2015), indicating that PPAR γ is required for proper macrophages function.

Pharmacological activation of PPARs in macrophages has shown significant benefits in inflammation attenuation *in vitro* and *in vivo* (Paukeri et al., 2013), furthermore, not only synthetic but endogenous PPAR γ ligands have inhibitory effects on proinflammatory mediators production and secretion (Caito et al., 2008). Moderate intensity exercise evidently enhances lipolysis in white adipocytes (Ogasawara et al., 2015) and PPAR γ may also be activated by lipid mediators released in the lipolysis acting in an anti-inflammatory manner (Capó, Martorell, Sureda, Tur, & Pons, 2016). Moreover, adipose tissue is an important regulator of metabolism by hormones and adipokines production and associated macrophages are crucial for the tissue homeostasis (Goh, Goh, & Abbasi, 2016).

Thus, due to this importance on exercise-mediated macrophages plasticity, and the PPAR γ transcriptional control, the aim of this study was to analyze alterations on metabolic and inflammatory parameters in PPAR γ knockout (KO) macrophages of mice submitted to 8-week moderate-exercise training.

2 | METHODS

2.1 | Animals

All procedures were approved by Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Institute of Biomedical Science (Protocol 112/13CEUA). All mice were from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), on a C57BL/6J background and kept at $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 12:12-hr light-dark cycle, with free access to tap water and food *ad libitum*. Mice with PPAR γ deletion in myeloid cells and littermate controls were produced by crossing PPAR γ Lox/Lox (B6.129-Ppargtm2Rev/J) with lysozyme M-cre (B6.129P2-Lyz2 < tm1(cre)lfo>/J) mice. Heterozygous PPAR γ Lox/WT; lysozyme M-cre $^{+/+}$ offspring (WT) were then crossed with PPAR γ Lox/Lox mice to obtain mice with the genotype PPAR γ Lox/Lox; lysozyme M-cre $^{+/+}$ (referred as KO) and their littermates PPAR γ Lox/Lox; lysozyme M-cre $^{-/-}$ (referred as WT). Genomic DNA from mouse tail was isolated for mice genotyping by polymerase chain reaction (PCR) using Taq polymerase purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel (KASVI) and visualized by ethidium bromide staining, using a 100-bp DNA ladder marker (Invitrogen; Supporting Information Figure S1). Male mice were fed with standard rodent chow diet (13% kcal from fat; Nuvilab, Colombo, PR, Brazil) for 12 weeks. At the end of the study, mice were euthanized by decapitation; blood was collected, and serum was obtained by centrifugation at 3000rpm for 10 min at 4°C .

2.2 | Experimental groups

Mice were subdivided into four groups (8–10 mice each): Wild-type (WT) sedentary, KO sedentary, WT trained, and KO trained. All animals were adapted to a treadmill for 1 week (10 min–10 m/min) and performed a maximum test speed in three moments (week 1/8, week 4/8, and week 8/8). Only trained groups were submitted to the exercise training protocol (5 days/week, 1 hr/day 60% of maximum speed test). After 72-hr resting from the last maximum speed test the animals were euthanized (6-hr fasting).

2.3 | Metabolic profile analysis

Nonesterified fatty acids (NEFA; HR Series NEFA-HR; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Richmond, VA), glucose, triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), and high-density lipoprotein (HDL) were analyzed in serum by a colorimetric method (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). Lipids were extracted from the liver with chloroform-methanol (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957) and TG concentrations were determined by enzymatic assay (Labtest). All assays were performed in duplicates.

2.4 | Insulin (ITT) and glucose tolerance tests (GTT)

After 4-hr fasting, mice received an intraperitoneal injection of insulin (1 U/kg body weight) or D-glucose (2 g/kg body weight). Blood drops were collected from the tail vein before and at 10, 20, 30, and

40 min after the insulin injection. The constant for serum glucose disappearance (KITT) was calculated by linear regression of glycemic levels measured between 5 and 15 min after insulin injection (Bonora et al., 1989). For GTT blood samples were collected from the tail vein before and at 15, 30, 60, 90, and 120 min after the glucose injection. The glucose concentrations at each time point were used to calculate the area under the curve (AUC). Accu-Chek Performa (Roche, São Paulo, SP, Brazil) was used to assess the levels of glucose and the interval of 72 hr between the two test was respected.

2.5 | Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Subcutaneous (inguinal) adipose tissue (80–100 mg) was homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer (0.625% Nonidet P-40, 0.625% sodium deoxycholate, 6.25 mM sodium phosphate, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA] at pH 7.4) containing 10 µg/ml of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After centrifugation, the supernatant was used to determine the protein concentration by the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Cytokines from the supernatant of cultured macrophages and from adipose tissue were assessed in duplicates by ELISA (DuoSet ELISA; R&D Systems, Minneapolis, MN).

2.6 | Peritoneal macrophage isolation and culture

Cytokine production was evaluated in macrophages obtained by washing the peritoneal cavity with 6 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) culture medium (Sigma-Aldrich), enriched with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. The lavage fluid was centrifuged at 100g, the supernatant aspirated, the cell pellet resuspended in 1 ml of complete medium, and a live cell count determined by using trypan blue exclusion and a hemocytometer (5×10^5). Macrophage-rich cultures were obtained by incubating peritoneal cells in 24-well polystyrene culture plates for 2 hr at 37°C in a 5% CO₂, humidified air environment. Nonadherent cells were removed by washing with RPMI. Adherent cells were then collected using cold phosphate-buffered saline (PBS) 2% simulated body fluid for further flow-cytometry analysis or incubated with 2.5 ng/ml of lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli*, serotype 0111:B4; Sigma-Aldrich) for 24 hr (Zhang, Goncalves, & Mosser, 2008). The medium was collected for the determination of interleukin-6 (IL-6), IL-10, IL-1 β , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IL-1 α , and TNF- α by ELISA (R&D System) according to the manufacturer's instruction.

2.7 | Adipose tissue-resident macrophages and peritoneal macrophages flow cytometry

Adipose tissue was digested with collagenase type II (2 mg/ml; Sigma-Aldrich) in PBS with EDTA (2 mM; Sigma-Aldrich) and 0.5% FBS for 60 min at 37°C in a shaker. The suspension was filtered using a cell strainer 100 µm and subsequently centrifuged at 400 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was decanted and the pellet was

resuspended in 3 ml lysis buffer (17 mM Tris-HCl + 0.144 M de cloreto de amônia, pH 7.2) for 2 min for purification of leukocytes. After centrifugation at 3,000 rpm for 10 min at 4°C, cells were washed with PBS and stained with the following antibody panel: Anti-CD11b, F4/80, CD11c, CD206, diluted 1:100 (BioLegend, San Diego, CA). M1 macrophages were characterized by expression of CD11c in adipose tissue-resident macrophages and CD86 in peritoneal macrophages concomitant with F4/80 and CD11b markers and M2 macrophages by expression of CD206 concomitant with F4/80 and CD11b markers (Supporting Information Table S2). The characterization of subpopulations of leukocytes was performed on the FACS CANTOII machine (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and data analysis was performed with FlowJo 9.5.3 software Tree Star (Ashland, OR).

2.8 | Real-time reverse transcription PCR

Macrophage total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY), following the method described by Chomczynski and Sacchi (1987). Reverse transcription to complementary DNA (cDNA) was performed using the high capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster, CA). Gene expression was evaluated by real-time PCR according to Higuchi, Dollinger, Walsh, and Griffith (1992), using Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) as a fluorescent dye. Primer sequences are shown in Supporting Information Table S1. Quantification of gene expression was carried out using the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene as an internal control, as previously described by Liu and Saint (2002).

2.9 | Statistical analysis

Results are presented as mean $\pm$ SEM. All groups were compared in the effects of genotype (WT $\times$ KO) and exercise (Sedentary $\times$ Trained) by using two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test using GraphPad Prism version 6.01 (La Jolla, CA). The significance level was set at $p < 0.05$.

3 | RESULTS

3.1 | Body composition and performance does not change by depleting PPAR γ in myeloid cells

We first analyzed mice caloric ingestion during time protocol. Despite a considerable reduction in caloric ingestion in both genotypes of trained mice (Figure 1) no significant changes in body weight or adiposity index (Supporting Information Figure S2) were found. All animals were submitted to a maximum speed test in the moments of the protocol and there was a tendency to increase the maximum speed on Test 2 (4 weeks) in the trained groups but this tendency did not extended to the final speed test (8 weeks; Supporting Information Figure S3).

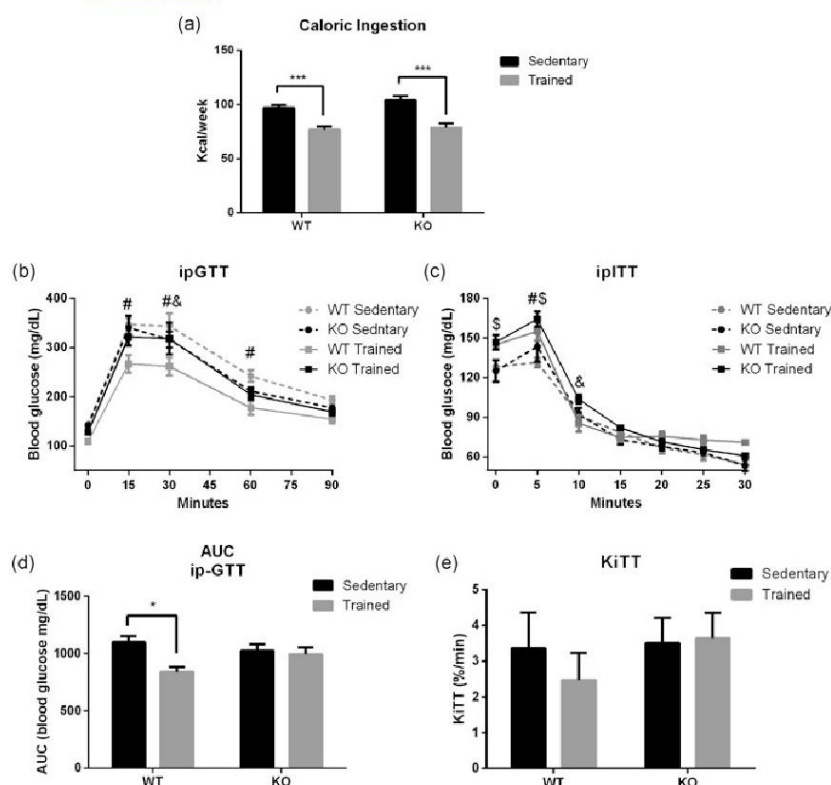


FIGURE 1 Effects of exercise on caloric ingestion and glucose homeostasis in mice with PPAR γ deletion in myeloid cells (KO) and littermate controls (WT). Average of caloric intake within 12 weeks of the protocol (a), ipGTT (b), ipITT (c), AUC of the glucose tolerance test (d), and KiTT (e). All values are mean $\pm$ SEM ($n = 8-10$ /group); two-way ANOVA followed by Bonferroni test. [#]WT Sedentary versus WT trained; ^{\$}KO Sedentary versus KO Trained; [^]WT Trained versus KO Trained; $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. ANOVA: analysis of variance; AUC: area under the curve; ipGTT: intraperitoneal glucose tolerance test; ipITT: intraperitoneal insulin tolerance test; KiTT: blood glucose lowering constant; KO: knockout; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptors γ ; WT: wild type

3.2 | Training improved metabolic parameters in PPAR γ KO mice

Regarding glucose homeostasis, we performed a GTT and ITT and observe that only WT when trained improved glucose uptake by decreasing the AUC (Figure 1d) and insulin sensibility by increasing KiTT (Figure 1e). To access the lipid profile, we performed colorimetric methods using the isolated serum. When compared genotypic differences between sedentary animals, was observed the lower concentration of TG on KO mice (Figure 2d). On the other hand, exercise was able to balance this difference in the trained groups. Also, KO mice, when trained, reduced total glucose (Figure 2a) but increased TC when compared with WT trained (Figure 2b).

Adiponectin was significantly higher only in WT mice when exercised (Figure 2c). HDLs and nonesterified fatty acids had no differences among genotypes or training (*data not shown*).

3.3 | Exercise boost immune response in the absence of PPAR γ in myeloid cells

Flow cytometry was used to identify M1 and M2 surface markers in peritoneal and adipose tissue-associated macrophages. There was no difference between M1 and M2 counts from sedentary WT and KO mice within the two macrophages subpopulations (Figure 3a,b). Exercise enhanced M1 and M2 peritoneal macrophages in WT but

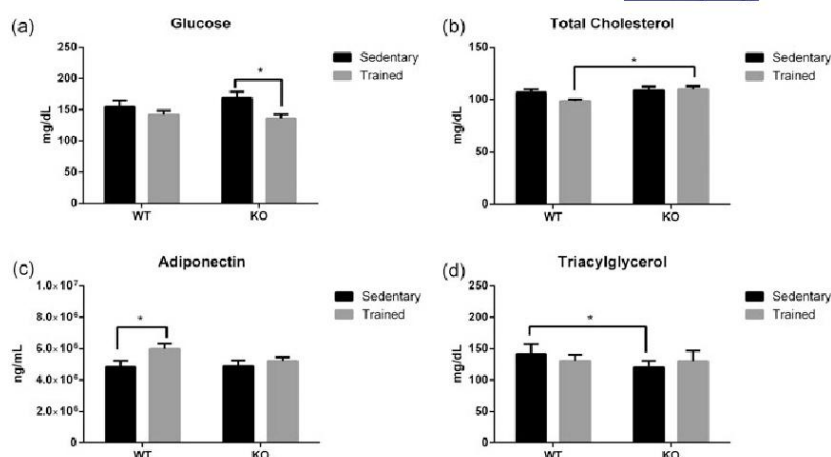


FIGURE 2 Effects of moderate exercise on metabolic variables in mice with PPAR γ deletion in myeloid cells (KO) and littermate controls (WT). Serum glucose (a), total cholesterol (b), adiponectin (c), and triacylglycerol (d). All values are mean $\pm$ SEM ($n = 8-10$ /group; two-way ANOVA followed by Bonferroni test; * $p < 0.05$. ANOVA: analysis of variance; KO: knockout; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptors γ ; WT: wild type

KO cells fail to boost M2 (Figure 3a) withal in adipose tissue macrophages there were a significant higher populations of M2 cells (Figure 3b).

We then analyzed pro- and anti-inflammatory cytokines content from the subcutaneous adipose tissue. No differences were observed between genotypes in sedentary groups. Exercise training was able to reduce the proinflammatory cytokine TNF- α in WT (Figure 4a). Exercised KO mice showed the tendency to raise MCP-1 ($p = 0.061$) when compared with sedentary KO (Figure 4c) and significant increased IL-6 and IL-1ra when compared with sedentary KO and trained WT. No modulations by genotype or exercise were observed in adipose tissue content of IL-1 β , IL-10, and adiponectin (Figure 4d,e,g).

To determinate cytokines production from peritoneal macrophages the cells were challenged or not with LPS for 24 hr. Our results showed that KO macrophages from sedentary mice presented higher TNF- α concentrations under nonstimulated and stimulated conditions and the exercise was able to restore this profile (Figure 5a). WT peritoneal macrophages from trained mice increased expression of IL-6, IL-1 β , IL-10, and IL-1ra under LPS stimulation. KO macrophages from trained mice presented higher IL-1ra in non-stimulated conditions (Figure 5f) but lower IL-6 (Figure 5b) and higher IL-1 β and IL-10 when stimulated (Figure 5d,e).

To understand the mechanisms behind peritoneal macrophages profile and cytokines release we evaluated some inflammatory target genes by RT-PCR. HIF-1 α was reduced in WT and KO trained when stimulated by LPS (Figure 6a). TLR4 from KO sedentary macrophages increased when stimulated with LPS but the exercise was able to restore this phenomenon (Figure 6b). There was no difference in NF- κ B mRNA expression (Figure 6c).

4 | DISCUSSION

We investigated herein whether myeloid cell PPAR γ is involved in the beneficial actions of moderate-intensity exercise training. We mainly found that exercise training reduces adipose tissue inflammation and cytokine secretion and stimulate macrophage polarization into an alternative M2 phenotype independent of myeloid cells PPAR γ .

Improvements in glucose tolerance or insulin sensitivity are expected effects of exercise also in normal diet mice (Gollisch et al., 2009), although this outcome was not found in KO mice. Our results showed that exercise did not affect KO mice glucose tolerance measured by intraperitoneal GTT but they presented lower resting glucose levels after exercise protocol. These mice had normal insulin function as shown by no significant alterations on fasting insulin, HOMA-IR or insulin resistance test compared with the WT, thus our hypothesis is that their initial fasting glucose was slightly higher than the other groups so small alterations such as low caloric intake and exercise were able to incite a decrease.

Differences in lipid profile between the genotypes also have to be highlighted. Sedentary KO mice had lower serum TG concentrations and a slight but no significant higher TG content in the liver when compared with WT sedentary mice, indicating that possibly TG has been accumulating in KO mice liver. Lack of PPAR γ in kupffer cells (liver macrophages) may lead to an M1 or classical activation, which is more glycolytic (Galvan-Pena & O'Neill, 2014). Additionally, previous studies observed upregulation of genes related to fatty acids biosynthesis (acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase) and gluconeogenesis (G6PC and Fbp1; Moran-Salvador et al., 2011)

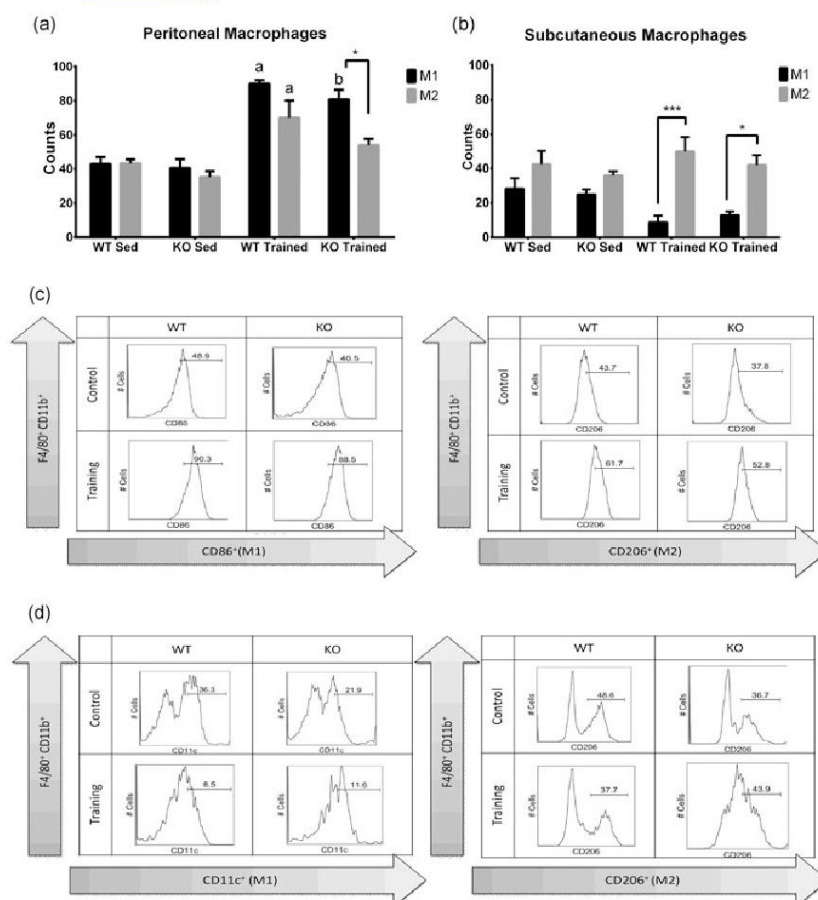


FIGURE 3 Flow cytometry of peritoneal macrophages (a) and a stromal portion from subcutaneous adipose tissue (b). Cells were isolated from the peritoneal cavity or enzymatically digested fat pads, and after the exclusion of doublets and debris, immune cells were identified by CD45 staining. A sequential gating strategy was first used to identify populations expressing specific markers (F4/80⁺CD11b⁺), followed by the identification of populations with overlapping expression patterns: Histogram of cell counts peritoneal macrophages M1 (CD86⁺), M2 (CD206⁺); c), and adipose tissue macrophages M1 (CD11c⁺) M2 macrophages (CD206⁺); d). Two-way ANOVA followed by Bonferroni test. ^aDifferent from WT sedentary; ^bdifferent from KO sedentary; ^{***} $p < 0.001$, ^{*} $p < 0.05$. KO: knockout; WT: wild type

in the liver of macrophage-specific PPAR γ KO mice, as a consequence, an accumulation of TG in the liver may occur.

An important adipokine that is involved in insulin sensitivity and glucose metabolism is adiponectin, which is produced by adipose tissue and controlled by PPAR γ (Astapova & Leff, 2012). Our model lacks PPAR γ in myeloid cell lineage but this mice phenotype also failed to increase adiponectin in the serum after exercise protocol. Studies have been suggesting that serum adiponectin can be a biomarker for PPAR γ activation in vivo

(Yang et al., 2004); moreover, in subcutaneous adipose tissue, the adiponectin content seems not be affected by the absence of PPAR γ . TNF- α has been strongly suggested as one of the molecules responsible for insulin resistance, more specific in 3T3-L1 adipocytes, Maeda et al. (2001) found that TNF- α had suppressor effects in adiponectin secretion in a dose-dependent manner, corroborating with the outcomes we had in adipose tissue, no changes in TNF- α concentration nor adiponectin differences between WT and KO sedentary groups.

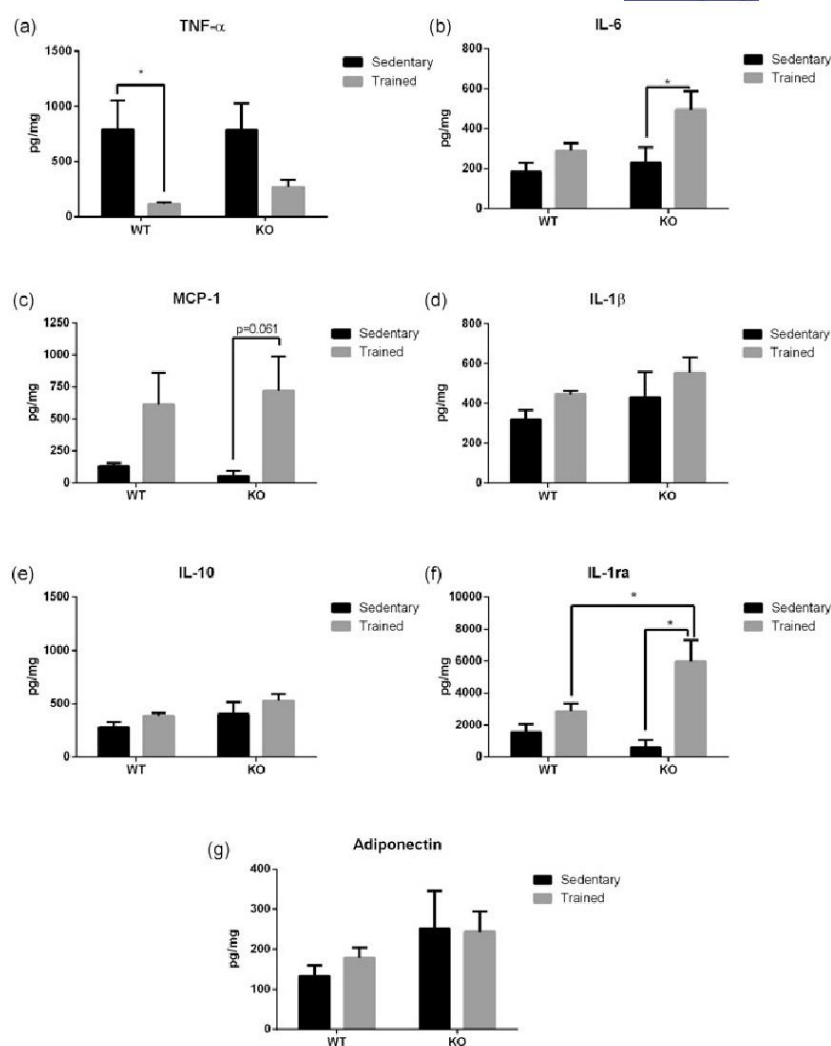


FIGURE 4 Effect of moderate exercise in subcutaneous adipose tissue cytokine content in mice with PPAR γ deletion in myeloid cells (KO) and littermates controls (WT). Content of TNF- α (a), IL-6 (b), MCP-1 (c), IL-1 β (d), IL-10 (e), IL-1ra (f), and adiponectin (g). Cytokine concentrations in the tissue were determined by ELISA ($n = 8-10$ /group) and expressed by total protein content. Data are presented as mean $\pm$ SEM; two-way ANOVA followed by Bonferroni test. * $p < 0.05$. ANOVA: analysis of variance; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IL-6: interleukin-6; IL-10: Interleukin-10; IL-1ra: interleukin-1 receptor antagonist; KO: knockout; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptors γ ; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; WT: wild type

Regarding macrophages switch, no difference between M1 and M2 subcutaneous and peritoneal macrophages from WT and KO sedentary mice was observed. However, when trained, both populations of peritoneal macrophages arose in WT, indicating that chronic

exercise recruits macrophages to the peritoneum. A strong hypothesis for this exacerbated recruitment on peritoneal cavity may be due to an increase in gastrointestinal permeability that has been discussed as a plausible consequence of the mechanical stress caused by running

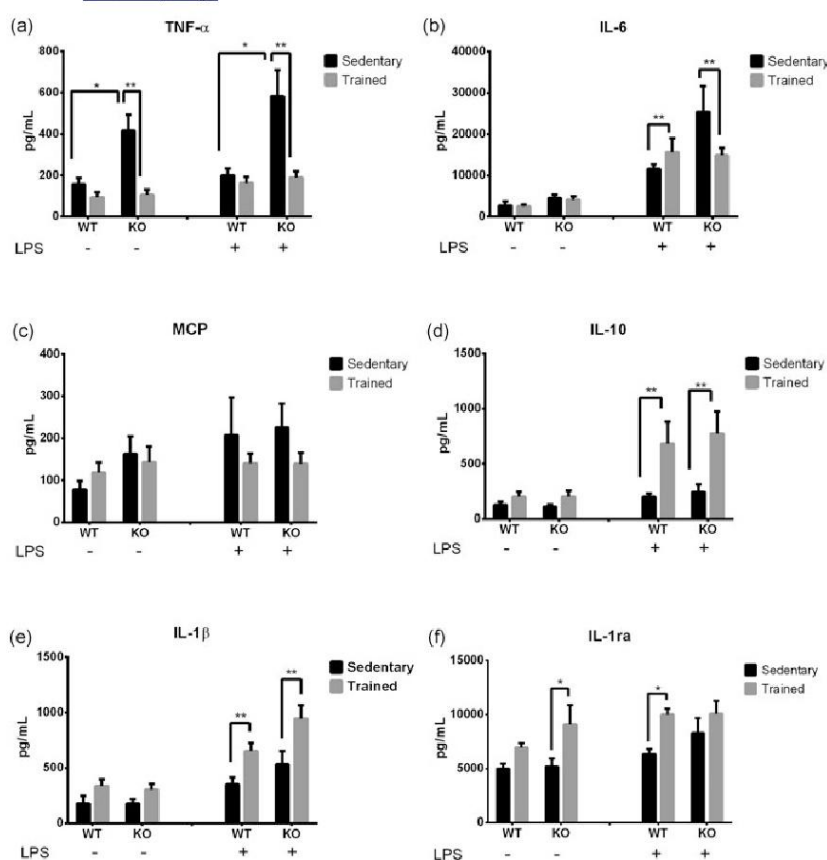


FIGURE 5 Effect of moderate exercise on basal and LPS-stimulated cytokine secretion by peritoneal macrophages of mice with PPAR γ deletion in myeloid cells (KO) and littermates controls (WT). TNF- α (a), IL-6 (b), MCP-1 (c), IL-10 (d), IL-1 β (e), and IL-1ra (f). Cytokines concentrations from the culture medium was determined by ELISA ($n = 8-10$ /group). Data are presented as mean $\pm$ SEM; two-way ANOVA followed by Bonferroni test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ANOVA: analysis of variance; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; IL-6: interleukin-6; IL-10: interleukin-10; IL-1ra: interleukin-1 receptor antagonist; IL-1 β : interleukin-1 β ; KO: knockout; LPS: lipopolysaccharide; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptors γ ; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; WT: wild type

(Karhu et al., 2017). KO mice also enhanced M1 population by exercise stimulus, but fail to increase M2 subset, indicating that PPAR γ might play a role in exercise-induced M2 peritoneal macrophages recruitment and polarization. M2 macrophages polarization as a result of exercise intervention has been shown in studies involving humans (Yakeu et al., 2010) and mice (Kawanishi, Yano, Yokogawa, & Suzuki, 2010), and the mechanisms involved in this are strongly associated with PPAR γ (Ruffino et al., 2016).

In subcutaneous adipose tissue, no overall increase in macrophages populations as showed in peritoneum but an exercise-induced M2

subset prevalence in both WT and KO mice. It suggests that adipose tissue-resident macrophages from lean mice may not require PPAR γ to assume M2 profile under trained condition. It is a topic that has been widely discussed in adipose tissue from obese animals (Ahn & Kim, 2014) although we could observe similar effects on the M2 phenotypic switch in lean mice. Further, this macrophages subset profile in subcutaneous adipose tissue was confirmed by cytokines content. No differences between sedentary genotypes but lower levels of a classic proinflammatory cytokine, TNF- α , was observed in WT trained animals. IL-6 protein content was elevated only in KO trained animals and a similar outcome

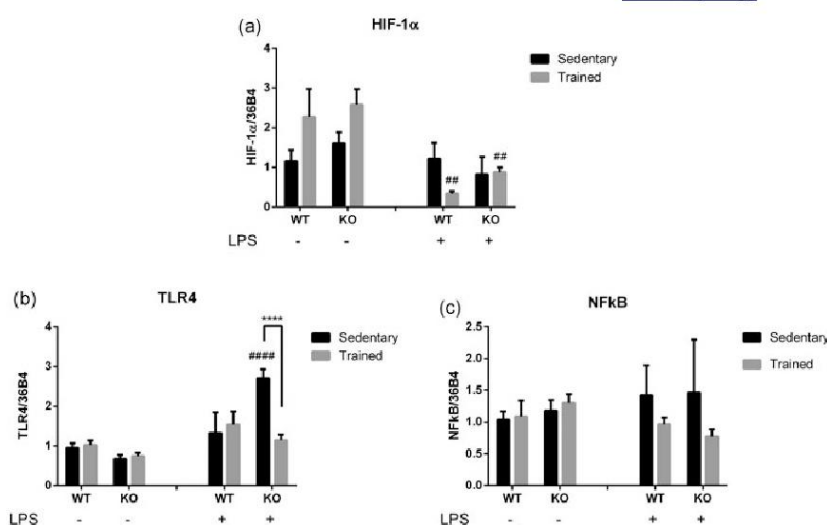


FIGURE 6 Gene expression from cultured macrophages. Expression of genes involved in inflammatory pathways in LPS-stimulated peritoneal macrophages. HIF-1 α (a), TLR4 (b), and NF- κ B (c). Data are shown as mean $\pm$ SEM folder; two-way ANOVA followed by Bonferroni test. # Different from nonstimulated $p < 0.01$, #### Different from nonstimulated $p < 0.0001$; **** $p < 0.0001$. ANOVA: analysis of variance; HIF-1 α : hypoxia-inducible factor 1- α ; LPS: lipopolysaccharide; NF- κ B: nuclear factor κ B; TLR4: toll-like receptor 4

was reported by Van Pelt, Guth, and Horowitz (2017) in overweight rats after aerobic acute exercise.

From other perspective, IL-6 also plays dual role being proinflammatory when associated to diseases such as metabolic syndrome (Bao, Liu, & Wei, 2015) and anti-inflammatory when induced by exercise in muscle fibers (Petersen & Pedersen, 2005) and in a subcutaneous adipose tissue even for long periods postexercise (Lyngsø, Simonsen, & Bülow, 2002). It is also known that IL-6 effect is lipolytic under stress situation (Lyngsø et al., 2002). We suggest that in this case, IL-6 might be released by adipocytes in response to exercise stress, once peritoneal macrophages do not present any alteration in this cytokine under basal conditions (non-LPS). MCP-1 and its receptor chemokine receptor type 2 CCR2 act as an attractant for monocytes and subsequently macrophages in adipose tissue and are considered as marker of inflammation (Lumeng, Bodzin, & Saltiel, 2007). We report a tendency in MCP-1 increase in KO trained animals but was not significant ($p < 0.06$), once more suggesting a susceptibility of KO mice to impaired anti-inflammatory effects of exercise.

Cytokine secretion from peritoneal macrophages showed that sedentary KO mice presented higher expression of TNF- α under control and LPS-stimulated conditions thus exercise training was able to lower it in both states, corroborating with studies performed in healthy and sedentary young male which observed decreases in serum TNF- α and interferon- γ levels (Jahromi et al., 2014). IL-6 levels from KO trained animals had a positive response to exercise under LPS stimulus, however, the same cytokine had an opposite response

in adipose tissue macrophages. It suggests that exercise plays an immunomodulatory role, and not just an anti-inflammatory function as constantly described in the literature (Pellegrin, Aubert, Bouzourène, Amstutz, & Mazzolai, 2015; Petersen & Pedersen, 2005). Agreeing with the hypothesis of exercise being immunomodulatory, peritoneal macrophages from trained animals also increased anti-inflammatory cytokines under LPS stimulation. As an example, IL-10 secretion by macrophages via TLR4 stimulation (e.g., LPS) may be an attempt to control the excess of proinflammatory cytokine secretion (Iyer, Ghaffari, & Cheng, 2010).

To better understand the mechanisms behind cytokines production we evaluated mRNA expression of some inflammatory genes and we could observe that TLR4 dramatically increase in KO sedentary mice after LPS exposure but was restored by exercise. TLR4 is a receptor that recognizes microbial structures and induces to immune responses by NF- κ B inflammatory pathway (Barton & Medzhitov, 2003). In this context, once again PPAR γ has to be highlighted by inhibiting transcriptional activation of NF- κ B in macrophages (Wang et al., 2015). It suggests that macrophages lacking PPAR γ react excessively to LPS stimulus and increase inflammation but exercise training was able to reduce this hyper-inflammation caused by PPAR γ deletion.

We conclude that PPAR γ is necessary to maintain macrophage appropriate response to inflammatory stimulus and macrophage polarization, affecting also whole body lipid metabolism and adiponectin profile. Exercise training showed as an efficient mechanism to restore the immune response fine-tune impaired by PPAR γ deletion in macrophages.

ACKNOWLEDGMENTS

The research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grant/Award Numbers 2016/01409-8, 2013/25310-2, and 2014/01246-6).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

ORCID

Loreana Sanches Silveira  <http://orcid.org/0000-0003-4429-0153>

REFERENCES

- Ahn, N., & Kim, K. (2014). 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. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 18(3), 311–318.
- Astapova, O., & Leff, T. (2012). Adiponectin and PPARgamma: Cooperative and interdependent actions of two key regulators of metabolism. *Vitamins and Hormones*, 90, 143–162.
- Bao, P., Liu, G., & Wei, Y. (2015). Association between IL-6 and related risk factors of metabolic syndrome and cardiovascular disease in young rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(8), 13491–13499.
- Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science*, 300(5625), 1524–1525.
- Bonora, E., Moghetti, P., Zancanaro, C., Cigolini, M., Querena, M., Cacciatori, V., ... Muggeo, M. (1989). Estimates of in vivo insulin action in man: Comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 68(2), 374–378.
- Caito, S., Yang, S. R., Kode, A., Edirisinghe, I., Rajendrasozhan, S., Phipps, R. P., & Rahman, I. (2008). Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2, PPARgamma agonists, differentially regulate cigarette smoke-mediated pro-inflammatory cytokine release in monocytes/macrophages. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(2), 253–260.
- Capó, X., Martorell, M., Sureda, A., Tur, J. A., & Pons, A. (2016). Effects of dietary Docosahexaenoic, training and acute exercise on lipid mediators. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 13, 16.
- Chen, M. F., Chen, H. I., & Jen, C. J. (2010). Exercise training upregulates macrophage MKP-1 and affects immune responses in mice. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 42(12), 2173–2179.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159.
- Denham, J., O'Brien, B. J., & Charchar, F. J. (2016). Telomere length maintenance and cardio-metabolic disease prevention through exercise training. *Sports Medicine*, 46(9), 1213–1237.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Galván-Peña, S., & O'Neill, L. A. (2014). Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, 5, 420.
- Goh, J., Goh, K. P., & Abbasi, A. (2016). Exercise and adipose tissue macrophages: New frontiers in obesity research? *Front Endocrinol (Lausanne)*, 7, 65.
- Gollisch, K. S. C., Brandauer, J., Jessen, N., Toyoda, T., Nayer, A., Hirshman, M. F., & Goodyear, L. J. (2009). Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 297(2), E495–E504.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10(4), 413–417.
- Iyer, S. S., Ghaffari, A. A., & Cheng, G. (2010). Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages. *Journal of Immunology*, 185(11), 6599–6607.
- Jahromi, A. S., Zar, A., Ahmadi, F., Krstrup, P., Ebrahim, K., Hovanloo, F., & Amani, D. (2014). Effects of endurance training on the serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in sedentary men. *Immune Network*, 14(5), 255–259.
- Karhu, E., Forsgård, R. A., Alanko, L., Alftan, H., Pussinen, P., Hämäläinen, E., & Korpela, R. (2017). Exercise and gastrointestinal symptoms: Running-induced changes in intestinal permeability and markers of gastrointestinal function in asymptomatic and symptomatic runners. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 117(12), 2519–2526.
- Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y., & Suzuki, K. (2010). Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exercise Immunology Review*, 16, 105–118.
- Kizaki, T., Takemasa, T., Sakurai, T., Izawa, T., Hanawa, T., Kamiya, S., ... Ohno, H. (2008). Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(1), 152–156.
- Lehrke, M., & Lazar, M. A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell*, 123(6), 993–999.
- Liu, W., & Saint, D. A. (2002). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), 347–353.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 175–184.
- Lyngsø, D., Simonsen, L., & Bülow, J. (2002). Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: The effect of exercise. *Journal of Physiology*, 543(Pt 1), 373–378.
- Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., ... Matsuzawa, Y. (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, 50(9), 2094–2099.
- Mirza, R. E., Fang, M. M., Novak, M. L., Urao, N., Sui, A., Ennis, W. J., & Koh, T. J. (2015). Macrophage PPARgamma and impaired wound healing in type 2 diabetes. *Journal of Pathology*, 236(4), 433–444.
- Morán-Salvador, E., López-Parra, M., García-Alonso, V., Titos, E., Martínez-Clemente, M., González-Pérez, A., ... Clària, J. (2011). Role for PPARgamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB Journal*, 25(8), 2538–2550.
- Odegaard, J. I., Ricardo-Gonzalez, R. R., Goforth, M. H., Morel, C. R., Subramanian, V., Mukundan, L., ... Chawla, A. (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 447(7148), 1116–1120.
- Ogasawara, J., Izawa, T., Sakurai, T., Sakurai, T., Shirato, K., Ishibashi, Y., ... Kizaki, T. (2015). The molecular mechanism underlying continuous exercise training-induced adaptive changes of lipolysis in white adipose cells. *Journal of Obesity*, 2015, 473430–10.
- Paukeri, E. L., Leppänen, T., Lindholm, M., Yam, M. F., Asmawi, M., Kolmonen, A., ... Moilanen, E. (2013). Anti-inflammatory properties of a dual PPARgamma/alpha agonist muraglitazar in vitro and in vivo models. *Arthritis Research & Therapy*, 15(2), R51.
- Pellegrin, M., Aubert, J. F., Bouzourène, K., Amstutz, C., & Mazzolai, L. (2015). Voluntary exercise stabilizes established angiotensin II-dependent

- atherosclerosis in mice through systemic anti-inflammatory effects. *PLOS One*, 10(11), e0143536.
- Van Pelt, D. W., Guth, L. M., & Horowitz, J. F. (2017). Aerobic exercise elevates markers of angiogenesis and macrophage IL-6 gene expression in the subcutaneous adipose tissue of overweight-to-obese adults. *Journal of Applied Physiology*, 123(5), 1150–1159.
- Petersen, A. M. W., & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology* (1985), 98(4), 1154–1162.
- Rao, Y. P., & Lokesh, B. R. (2016). Down-regulation of NF-kappaB expression by n-3 fatty acid-rich linseed oil is modulated by PPARgamma activation, eicosanoid cascade and secretion of cytokines by macrophages in rats fed partially hydrogenated vegetable fat. *European Journal of Nutrition*, 56, 1135–1147.
- Ruffino, J. S., Davies, N. A., Morris, K., Ludgate, M., Zhang, L., Webb, R., & Thomas, A. W. (2016). Moderate-intensity exercise alters markers of alternative activation in circulating monocytes in females: A putative role for PPARgamma. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 116(9), 1671–1682.
- Tugal, D., Liao, X., & Jain, M. K. (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(6), 1135–1144.
- Wang, L., Chen, K., Liu, K., Zhou, Y., Zhang, T., Wang, B., & Mi, M. (2015). DHA inhibited AGEs-induced retinal microglia activation via suppression of the PPARgamma/NFkappaB pathway and reduction of signal transducers in the AGEs/RAGE axis recruitment into lipid rafts. *Neurochemical Research*, 40(4), 713–722.
- Yakeu, G., Butcher, L., Isa, S., Webb, R., Roberts, A. W., Thomas, A. W., ... Morris, K. (2010). Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: Roles of PPARgamma and Th2 cytokines. *Atherosclerosis*, 212(2), 668–673.
- Yang, B., Brown, K. K., Chen, L., Carrick, K. M., Clifton, L. G., McNulty, J. A., ... Pahl, G. L. (2004). Serum adiponectin as a biomarker for in vivo PPARgamma activation and PPARgamma agonist-induced efficacy on insulin sensitization/lipid lowering in rats. *BMC Pharmacology*, 4, 23.
- Zhang, X., Goncalves, R., & Mosser, D. M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol, Chapter 14 (Unit 14)*, 11.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Silveira LS, Batatinha HAP, Castoldi A, et al. Exercise rescues the immune response fine-tuned impaired by peroxisome proliferator-activated receptors γ deletion in macrophages. *J Cell Physiol*. 2018;1–11. <https://doi.org/10.1002/jcp.27333>