

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO

---

**TESE DE DOUTORADO**

**IMPACTO DA APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA SOBRE A  
POLARIZAÇÃO DOS MONÓCITOS: AÇÃO DA AMPK E LEPTINA**

**CAÍQUE DE FIGUEIREDO**

**2025**

**PRESIDENTE PRUDENTE**

---

CAÍQUE DE FIGUEIREDO

---

**IMPACTO DA APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA SOBRE A  
POLARIZAÇÃO DOS MONÓCITOS: AÇÃO DA AMPK E LEPTINA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento, da Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do Movimento.

**Orientador:** Prof. Dr. Fábio Santos Lira.

2025

**PRESIDENTE PRUDENTE**

F475i Figueiredo, Caíque de  
Impacto da aptidão cardiorrespiratória sobre a polarização dos monócitos: ação da AMPK e leptina / Caíque de Figueiredo. -- Presidente Prudente, 2025  
150 p. : il., tabs., fotos

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

1. Educação física. 2. Aptidão cardiorrespiratória. 3. Sistema imunológico. I. Título.

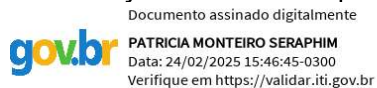
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE: IMPACTO DA APTIDÃO CARDIORRESPIRATÓRIA SOBRE A POLARIZAÇÃO DOS MONÓCITOS: AÇÃO DA AMPK E LEPTINA**

**AUTOR: CAÍQUE DE FIGUEIREDO**

**ORIENTADOR: FÁBIO SANTOS DE LIRA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências do Movimento, área: Avaliação e Intervenção em Fisioterapia pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. PATRICIA MONTEIRO SERAPHIM (Participação Presencial)  
Departamento de Fisioterapia / UNESP - Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. CLAUDIA REGINA CAVAGLIERI (Participação Virtual)  
Departamento de Educação Física / Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. LILA MISSAE OYAMA (Participação Virtual)  
Departamento de Fisiologia / Universidade Federal de São Paulo - SP

Profa. Dra. ALESSANDRA PERES (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Básicas da Saúde / Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Câmpus de Presidente Prudente**

Prof. Dr. EDUARDO ZAPATERRA CAMPOS (Participação Virtual)  
Departamento de Educação Física / Universidade Federal de Pernambuco

Presidente Prudente, 21 de fevereiro de 2025

## **IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA**

Esta tese de doutorado apresenta resultados inéditos relacionados à participação benéfica do condicionamento físico na função dos monócitos (importantes células do sistema imunológico) e aos mecanismos envolvidos nessa interação. Espera-se que os resultados sejam utilizados por pesquisadores para avançar ainda mais na fronteira do conhecimento relacionada com a prática de exercício físico e sistema imunológico, o que constitui um importante alvo de pesquisa para a prevenção e o tratamento de doenças (impacto científico).

Adicionalmente, os resultados da presente pesquisa reforçam ainda mais a necessidade de ser fisicamente ativo e de praticar exercícios físicos, independentemente da idade e da composição corporal. A incorporação da prática regular de exercício físico pelo público em geral é determinante para o aumento do bem-estar e qualidade de vida (impacto social), assim como para a redução dos gastos públicos relacionados a problemas de saúde e ao absenteísmo (impacto econômico).

## **POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH**

This doctoral thesis presents unprecedented results related to the beneficial role of physical fitness in the function of monocytes (important cells of the immune system) and the mechanisms involved in this interaction. It is expected that the results will be used by researchers to further advance the frontier of knowledge related to physical exercise and the immune system, which constitutes an important research target for the prevention and treatment of diseases (scientific impact).

Additionally, the results of this study further reinforce the need to be physically active and to engage in physical exercise, regardless of age and body composition. The incorporation of regular physical exercise by the general public is crucial for improving well-being and quality of life (social impact), as well as for reducing public expenditures related to health issues and absenteeism (economic impact).

*"In Memoriam"*

*Dedico a presente tese ao meu padrinho, Edinho, cuja presença e ensinamentos  
continuam a influenciar minha vida e meu caminho.*

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Paula (dona Parla ou mamitia), pela educação e amor que me deu. Uma mulher batalhadora que admiro MUITO e tenho sorte de ser minha mãe. Às minhas irmãs, Karina (Karinona) e Sabrina (Sabrinona), pela amizade e confiança que existe entre nós. Aos meus sobrinhos, Isa, Kauã e João, vocês são nossa alegria. Ao meu amor, Tati (formiguinha), pela força, parceria e aconchego em todos os momentos. Ao meu padrasto Clóvis, sinônimo de garra e humildade, obrigado por fazer parte da nossa família. Para todas as conquistas que eu obtive e quero obter, penso e pensarei em vocês como fonte de força, determinação, confiança e amor.

À minha avó (dona Isabel), tios, tias, padrinhos e madrinhas (em especial, Edinho, Paulo, Cecília, Zéti, Rosa, Dimas, Cleone e Lézin) por toda ajuda, conselhos e momentos. Sem todos vocês, a minha “caminhada” para uma cidade distante para realizar uma graduação sequer teria acontecido.

Aos amigos/colegas de Presidente Prudente, especialmente aqueles que conheci na Moradia Estudantil, academia Set Fit e na “cozinha interna”. Sou muito grato por toda a experiência e amizade.

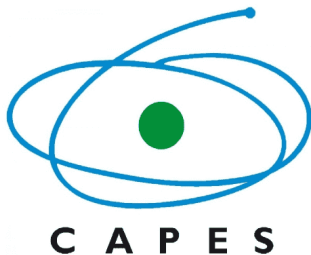
Ao meu orientador, Fábio. Agradeço imensamente as oportunidades que me deu, confiança em meu trabalho, conselhos e paciência nos momentos difíceis. Obrigado também aos companheiros do Laboratório de Fisiologia Celular do Exercício (LaFiCE), especialmente alguns “das antigas” (Neto, Dani, Bah, Paulinha, Taxilaine e Sérgera), aqueles não tão antigos assim (Tiaguera, Ana e Pri, que permaneceram), outros relativamente mais novos (Pedro, Ivete, Bruna, Cielo, Marta, Thalita e Vinicius) e aos vários que passaram e, com toda certeza, contribuíram de alguma forma. Cada um de vocês foi muito importante!

Aos professores e funcionários da UNESP, bem como os participantes da pesquisa, que diretamente ou indiretamente contribuíram para que esta pesquisa acontecesse.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

## 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 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado no Brasil (processo 2019/26378-6) e no exterior (processo 2021/11060-0). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP".



## RESUMO

A baixa aptidão cardiorrespiratória (ACR) está relacionada com o estabelecimento de processos inflamatórios crônicos não resolvidos e ao desenvolvimento de diferentes doenças crônicas não transmissíveis. Um dos gatilhos para o desenvolvimento e manutenção do quadro inflamatório crônico é o desequilíbrio no número e na função dos monócitos. Indivíduos com menor ACR, especialmente associada ao envelhecimento e/ou excesso de gordura visceral, apresentam aumento de monócitos polarizados para o fenótipo de monócitos/macrófagos pró-inflamatórios (“like-M1”). Por outro lado, a polarização para o fenótipo anti-inflamatório (“like-M2”) é predominante em indivíduos com alta ACR e praticantes de exercício físico regular. Mecanismos moleculares e hormonais, como os relacionados à ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) ou à sinalização da leptina, coordenam as mudanças fenotípicas, embora a ação sobre o fenótipo de monócitos polarizados, de acordo com o *status* da ACR, seja desconhecida. Portanto, o objetivo proposto nesta tese foi verificar o impacto da ativação da AMPK sobre a polarização de monócitos para o fenótipo “like-M1” e “like-M2”, de acordo com o *status* da ACR e idade (objetivo 1). Adicionalmente, examinar a ação da leptina durante a polarização de monócitos para o fenótipo “like-M1” e “like-M2”, de acordo com o *status* da ACR (objetivo 2). Foram recrutados indivíduos do sexo masculino, não diagnosticados com doenças, com idade entre 18 e 35 (jovens) e 45 a 59 (meia idade) anos. A ACR foi mensurada, e os voluntários foram divididos em dois grupos para as comparações principais: 1) Indivíduos com alta ACR (n = 12) e 2) Indivíduos com baixa ACR (n = 15). Adicionalmente, subanálises visando o impacto da ACR no perfil inflamatório e metabólico, de acordo com a idade, foram desenvolvidas com três subgrupos: 1) Jovens Baixa-ACR (n = 12), 2) Jovens Alta-ACR (n = 8) e 3) Meia idade-Alta ACR (n = 7). O sangue foi coletado para o isolamento dos monócitos e polarização para o fenótipo “like-M1” ou “like-M2”, na ausência ou presença da leptina e/ou ativação da AMPK. O perfil inflamatório e metabólico, composição corporal, nível de atividade física, comportamento sedentário e ingestão alimentar foi caracterizado. Como principais resultados, foi demonstrado que indivíduos com baixa ACR apresentam fenótipo mais pró-inflamatório dos monócitos polarizados na ausência ou presença da leptina. A ativação da AMPK engrenou o perfil anti-inflamatório, independentemente do nível da ACR, idade e presença da leptina, especialmente nos monócitos estimulados para o fenótipo “like-M1”. Em conclusão, os resultados sugerem que a leptina atua diferencialmente na indução da secreção de citocinas durante polarização dos monócitos em indivíduos com diferente *status* da ACR. Por outro lado, a ativação da AMPK induz fenótipo anti-inflamatório durante polarização para o fenótipo “like-M1”, independentemente do nível da ACR, idade entre os participantes com alta ACR e presença da leptina. **Palavras-chave:** Exercício físico. Atividade física. Inflamação. Macrófagos. Tecido adiposo.

## ABSTRACT

Low cardiorespiratory fitness (CRF) is related to the establishment of unresolved chronic inflammatory processes and the development of various chronic non-communicable diseases. One of the triggers for the development and maintenance of chronic inflammatory conditions is the imbalance in the number and function of monocytes. Individuals with lower CRF, especially when associated with aging and/or visceral fat excess, show an increase in monocytes polarized to the pro-inflammatory phenotype of monocytes/macrophages (“like-M1”). On the other hand, the anti-inflammatory polarization (“like-M2”) predominates in individuals with high CRF and those who engage in regular physical exercise. Molecular and hormonal mechanisms, such as those related to the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) or leptin signaling, coordinate the phenotypic changes, although the action on the phenotype of polarized monocytes, according to CRF status, is unknown. Therefore, the aim proposed in this thesis was to verify the impact of AMPK activation on the polarization of monocytes to the “like-M1” and “like-M2” phenotypes, according to CRF status and age (Objective 1). Additionally, to examine the action of leptin during the polarization of monocytes to the “like-M1” and “like-M2” phenotypes, according to CRF status (Objective 2). Male individuals, not diagnosed with diseases, aged between 18 and 35 (young) and 45 to 59 (middle-aged) years, were recruited. CRF was measured, and the volunteers were divided into two main groups for comparison: 1) Individuals with high CRF (n = 12) and 2) Individuals with low CRF (n = 15). Additionally, sub-analyses aimed at the impact of CRF on the inflammatory and metabolic profiles, according to age, were developed with three subgroups: 1) Young Low-CRF (n = 12), 2) Young High-CRF (n = 8), and 3) Middle-aged High CRF (n = 7). Blood was collected for monocyte isolation and polarization to the “like-M1” or “like-M2” phenotype, in the absence or presence of leptin and/or AMPK activation. Inflammatory and metabolic profiles, body composition, physical activity level, sedentary behavior, and dietary intake were characterized. The main results showed that individuals with low CRF exhibited a more pro-inflammatory phenotype of polarized monocytes, both in the absence or presence of leptin. AMPK activation promoted the anti-inflammatory profile, regardless of CRF level, age, or leptin presence, especially in monocytes stimulated to the “like-M1” phenotype. In conclusion, the results suggest that leptin differentially acts in the induction of cytokine secretion during monocyte polarization in individuals with different CRF status. On the other hand, AMPK activation induces an anti-inflammatory phenotype during polarization to the “like-M1” phenotype, independent of CRF level, age among participants with high CRF, and leptin presence. **Keywords:** Physical exercise. Physical activity. Inflammation. Macrophages. Adipose tissue.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Relação entre baixa aptidão cardiorrespiratória, inatividade física e alto comportamento sedentário, com processos inflamatórios não resolvidos e desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

**Figura 2.** Recrutamento dos monócitos no contexto basal e inflamatório. Adaptado de Jakubzick et al. (2017).

**Figura 3.** Ação da AMPK na polarização dos macrófagos. Adaptado de Cui et al. (2023).

**Figura 4.** Impacto da hipertrofia do tecido adiposo, envelhecimento e hiperleptinemia sobre a polarização dos monócitos/macrófagos. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

**Figura 5.** Grupos experimentais. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

**Figura 6.** Polarização dos monócitos. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

**Figura 7.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com o status da ACR.

**Figura 8.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com os subgrupos experimentais.

**Figura 9.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M1” por 24 horas. A expressão gênica de diferentes genes foi analisada após polarização e apresentada de acordo com o status da ACR.

**Figura 10.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M2” por 24 horas. A expressão gênica de diferentes genes foi analisada após polarização e apresentada de acordo com o status da ACR.

**Figura 11.** Monócitos CD14+ foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com o status da ACR.

**Figura 12.** Monócitos CD14+ foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com os subgrupos experimentais.

**Figura 13.** Monócitos CD14+ foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). O delta percentual relativo ao poço controle (não estimulado com AICAR) das concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 do sobrenadante de cultura após polarização é apresentado de acordo com os grupos experimentais.

**Figura 14.** Monócitos CD14+ foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). O delta percentual relativo ao poço controle (não estimulado com AICAR) das concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 do sobrenadante de cultura após polarização é apresentado de acordo com os subgrupos experimentais.

**Figura 15.** Monócitos CD14+ foram polarizados para o fenótipo “like-M1” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). A expressão gênica de diferentes genes foi analisada após polarização e apresentada de acordo com o status da ACR.

**Figura 16.** Monócitos CD14+ foram polarizados para o fenótipo “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). A expressão gênica de diferentes genes foi analisada após polarização e apresentada de acordo com o status da ACR.

**Figura 17.** Diferença nas concentrações da leptina, adiponectina e razão dessas adipocinas com a quantidade do tecido adiposo branco total nos subgrupos experimentais.

**Figura 18.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M1” por 24 horas associado ao tratamento com diferentes concentrações de leptina. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas integralmente ou relativas (delta percentual) de acordo com o status da ACR.

**Figura 19.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com diferentes concentrações de leptina. As concentrações do TNF- $\alpha$  e IL-6 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas integralmente ou relativas (delta percentual) de acordo com o status da ACR.

**Figura 20.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR) e diferentes concentrações de leptina. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com o status da ACR.

**Figura 21.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR) e 40 ng/mL de leptina. O delta percentual, relativo às células tratadas com 40 ng/mL de leptina (não estimuladas com AICAR), das concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 do sobrenadante da cultura após polarização é apresentado de acordo com o status da ACR.

**Figura 22.** Perfil inflamatório/metabólico sistêmico dos subgrupos experimentais.

**Figura 23.** Fenotipagem das subpopulações dos monócitos de acordo com os subgrupos experimentais.

**Figura 24.** Fenotipagem das subpopulações de linfócitos de acordo com os subgrupos experimentais.

**Figura 25.** PBMCs estimuladas com LPS por 24 horas. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após incubação e apresentadas integralmente ou relativas de acordo com os subgrupos experimentais.

**Figura 26.** PBMCs estimuladas com PMA+ionomicina por 24 horas. As concentrações do IFN- $\gamma$  e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após incubação e apresentadas integralmente ou relativas de acordo com os subgrupos experimentais.

**Figura 27.** Ensaio do sangue total estimulado LPS por 6 horas. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 foram analisadas do sobrenadante após incubação e apresentadas de acordo com os subgrupos experimentais. Os valores apresentados são referentes exclusivamente à condição estimulada com LPS, uma vez que as concentrações da condição sem estímulo não foram detectadas.

**Figura 28.** Principais achados. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

**Figura 29.** Hipótese para a aplicação dos resultados. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

**Figura 30.** Imagens dos monócitos realizadas através da microscopia eletrônica de transmissão.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para análise de expressão gênica.

**Tabela 2.** Caracterização da amostra.

**Tabela 3.** Comportamento alimentar.

**Tabela 4.** Correlação entre as concentrações sistêmicas da leptina e liberação das citocinas em monócitos “like-M1” e “like-M2”.

**Tabela Suplementar 1.** Caracterização da amostra.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACR** = Aptidão cardiorrespiratória, *Cardiorespiratory fitness*

**AIC** = Critério de Informações de Akaike, *Akaike Information Criterion*

**AICAR** = Ribonucleotídeo 5-aminoimidazol-4-carboxamida, *5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide*

**AKT** = Proteína quinase B, *Protein kinase B*

**AMPK** = Quinase ativada por adenosina monofosfato, *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*

**ANOVA-One Way** = Análise de variância de uma via, *One-way analysis of variance*

**BDNF** = Fator neurotrófico derivado do cérebro, *Brain-derived neurotrophic factor*

**CCR2** = Receptor de quimiocina Motif C-C-tipo 2, *C-C motif chemokine receptor type 2*

**CCR7** = Receptor de quimiocina Motif C-C-tipo 7, *C-C motif chemokine receptor type 7*

**CD** = Cluster de diferenciação, *Cluster of differentiation*

**cDNA** = DNA complementar, *Complementary DNA*

**CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>** = Monócitos clássicos, *Classical monocytes*

**CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup>** = Monócitos intermediários, *Intermediate monocytes*

**CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup>** = Monócitos não clássicos, *Non-classical monocytes*

**CMV** = Citomegalovírus, *Cytomegalovirus*

**CREB** = Proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP, *cAMP response element-binding protein*

**DEXA** = Absorciometria de raios-X de dupla energia, *Dual-energy X-ray absorptiometry*

**ELISA** = Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima, *Enzyme-linked immunosorbent assay*

**GLM** = Modelo linear generalizado, *Generalized linear model*

**HPRT** = Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase, *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*

**HLA-DR** = Antígeno leucocitário humano classe II – DR, *Human leukocyte antigen class II -*

*DR*

**HIF-1 $\alpha$**  = Fator induzível por hipóxia do tipo alfa, *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

**HOMA-IR** = Modelo de homeostase da resistência à insulina, *Homeostatic model assessment of insulin resistance*

**HSV** = Herpes-simples, *Herpes simplex virus*

**IKK $\beta$**  = Proteína fosforilada beta inibidora da quinase I kappa B, *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*

**IL** = Interleucina, *Interleukin*

**IL-1 $\beta$**  = Interleucina-1 beta, *Interleukin-1 beta*

**IL-1RA** = Receptor antagonista da interleucina-1, *Interleukin-1 receptor antagonist*

**IL-10RA** = Subunidade alfa do receptor da interleucina-10, *Interleukin-10 receptor subunit alpha*

**IFN- $\alpha$**  = Interferon-alfa, *Interferon-alpha*

**IFN- $\gamma$**  = Interferon-gama, *Interferon-gamma*

**IMC** = Índice de massa corporal, *Body mass index*

**iNOS** = Oxido nítrico induzível, *Inducible nitric oxide synthase*

**IPAQ** = Questionário Internacional de Atividade Física, *International Physical Activity Questionnaire*

**Jmjd3** = Enzima contendo o domínio *Jumonji-3*, *Jumonji domain-containing protein 3*

**JNK** = Quinase do N-terminal da c-Jun, *c-Jun N-terminal kinase*

**K3-EDTA** = Trissódio etilenodiamino tetraacetato de potássio, *Tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid*

**LaFICE** = Laboratório de Fisiologia Celular do Exercício, *Laboratory of Cellular Exercise Physiology*

**LPS** = Lipopolissacarídeo, *Lipopolysaccharide*

**MCP-1** = Proteína quimioatraente de monócitos do tipo-1, *Monocyte chemoattractant protein-1*

**MHC** = Complexo de histocompatibilidade principal, *Major histocompatibility complex*

**mTORC1** = Complexo 1 do alvo mecanístico da rapamicina, *Mechanistic target of rapamycin complex 1*

**mTORC2** = Complexo 2 do alvo mecanístico da rapamicina, *Mechanistic target of rapamycin complex 2*

**M1** = Macrófagos pró-inflamatórios, *Pro-inflammatory macrophages*

**M2** = Macrófagos anti-inflamatórios, *Anti-inflammatory macrophages*

**NADH** = Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (forma reduzida), *Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)*

**NF-κB** = Fator nuclear-kappa B, *Nuclear factor-kappa B*

**NK** = Células assassinas naturais, *Natural killer cells*

**NLRP3** = Receptor tipo NOD contendo domínio *pyrin 3*, *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*

**Ob-Rb** = Receptor da leptina-isoforma b, *Leptin receptor isoform b*

**PAI-1** = Inibidor do ativador de plasminogênio-1, *Plasminogen activator inhibitor-1*

**PBMCs** = Células mononucleares do sangue periférico, *Peripheral blood mononuclear cells*

**PD-1** = Proteína de morte celular programada 1, *Programmed cell death protein 1*

**PGC-1β** = Coativador 1α do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos-β, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta*

**PI3K** = Fosfatidilinositol-3-quinase, *Phosphatidylinositol 3-kinase*

**PKM2** = Piruvato quinase M2, *Pyruvate kinase M2*

**PMA** = *Phorbol 12-miristato 13-acetato*, *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

**PPAR- $\gamma$**  = Receptor ativado por proliferador de peroxissomo- isoforma  $\gamma$ , *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

**RNA** = Ácido ribonucleico, *Ribonucleic acid*

**RPMI** = Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute, Roswell Park Memorial Institute culture medium*

**RT-PCR** = Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa, *Reverse transcription polymerase chain reaction*

**Sirt1** = Sirtuina 1, *Sirtuin 1*

**STAT** = Sinal transdutor e ativador de transcrição, *Signal transducer and activator of transcription*

**TBCA** = Tabela brasileira de composição de alimentos, *Brazilian Food Composition Table*

**TGF- $\beta$**  = Fator de crescimento transformador-beta, *Transforming growth factor-beta*

**Th1** = Células T auxiliares-tipo 1, *T-helper type 1 cells*

**TLR-2** = Receptor do tipo *toll-like 2, Toll-like receptor 2*

**TLR-4** = Receptor do tipo *toll-like 4, Toll-like receptor 4*

**TNF- $\alpha$**  = Fator de necrose tumoral-alfa, *Tumor necrosis factor-alpha*

**UDP-GlcNac** = Uridina difosfato N-acetilglucosamina, *Uridine diphosphate N-acetylglucosamine*

**VO<sub>2</sub>** = Consumo de oxigênio, *Oxygen consumption*

**VO<sub>2max</sub>** = Consumo máximo de oxigênio, *Maximal oxygen consumption*

**VO<sub>2pico</sub>** = Consumo pico de oxigênio, *Peak oxygen consumption*

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
Inatividade física e baixa ACR, resposta inflamatória e doenças crônicas não transmissíveis .....	21
Fenótipo e função dos monócitos/macrófagos de acordo com o ambiente inflamatório .....	25
Influência da idade, excesso de gordura corporal e leptina no fenótipo e função dos monócitos/macrófagos .....	33
Perfil anti-inflamatório frente a prática regular de exercício físico e maior aptidão cardiorrespiratória.....	38
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>43</b>
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>44</b>
Objetivos específicos .....	44
<b>HIPÓTESE DO ESTUDO .....</b>	<b>45</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
Participantes e design do estudo .....	45
Avaliação da ACR .....	48
Antropometria e avaliação da composição corporal.....	48
Registro alimentar e IPAC .....	49
Coletas de sangue .....	49
Análise de parâmetros sanguíneos.....	50
Ensaio do sangue total estimulado.....	50
Separação das PBMCs e citometria de fluxo.....	51
Cultura das PBMCs .....	52
Isolamento e polarização dos monócitos “like-M1” e “like-M2”.....	53
Análise da expressão gênica por RT-PCR.....	54
Procedimentos de Análise Estatística dos Dados .....	55
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
Caracterização da amostra .....	57
Objetivo 1: Impacto da aptidão cardiorrespiratória na polarização dos monócitos.....	61
Objetivo 1: Ativação da AMPK engrena fenótipo anti-inflamatório independente do status da ACR .....	67
Objetivo 2: Exposição à leptina estimula fenótipo pró-inflamatório após polarização dos monócitos de indivíduos com baixa ACR, mas não alta ACR.....	75
Objetivo 2 (extensão): Ação anti-inflamatória da AMPK na polarização para o fenótipo “like-M1” permanece, mesmo na presença da leptina .....	81
Impacto da ACR no perfil inflamatório sistêmico e resposta inflamatória entre as células imunológicas.....	83
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>91</b>

<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>128</b>

## INTRODUÇÃO

O século XXI é marcado pela incidência de uma série de doenças crônicas não transmissíveis, mediadas, em partes, pela inatividade física e aumento do comportamento sedentário (Park et al., 2020; Lang et al., 2024). É postulado que o processo inflamatório crônico ou inflamação crônica de baixo grau conecta a ausência/redução de movimento do corporal e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (Cifuentes et al., 2025). Além disso, o acúmulo de gordura corporal e o avanço da idade são fatores que favorecem o quadro inflamatório crônico, especialmente, em indivíduos inativos fisicamente (Rodríguez-Hernández et al., 2013; Frasca et al., 2017). O ambiente inflamatório crônico (celular e sistêmico) é acompanhado por elevações nas concentrações de marcadores inflamatórios, disfunções metabólicas e maior atividade pró-inflamatória de diferentes células imunológicas, dentre elas, os monócitos e macrófagos (Cifuentes et al., 2025).

Nesse contexto, monócitos e macrófagos apresentam alterações em número, proporção das subpopulações e função (Cifuentes et al., 2025). O fenótipo dessas células é marcado pelo aumento na liberação de mediadores inflamatórios, bem como pela reprogramação metabólica que, frequentemente, induz maior participação da via glicolítica e redução da fosforilação oxidativa (Van den Bossche et al., 2017). Em conjunto, essas alterações favorecem o desenvolvimento da função citotóxica, apresentadora de antígeno, processos quimiotáticos, dentre outras (Park et al., 2022). A manutenção crônica desse estado de ativação é relacionada com o desenvolvimento e manutenção da inflamação crônica de baixo grau (Park et al., 2022).

Por outro lado, a prática regular de exercício físico promove efeitos anti-inflamatórios e contrarreguladores ao quadro inflamatório crônico (Winn et al., 2021). Indivíduos que exibem maior aptidão cardiorrespiratória (ACR) e que praticam exercício físico regular, se beneficiam da redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis e do melhor prognóstico frente às doenças crônicas (Lang et al., 2024). Um dos mecanismos propostos é o balanço/ajuste da função dos monócitos e macrófagos, no qual é inclinado para o perfil mais anti-inflamatório (Voskoboynik et al.,

2024). Alterações em mecanismos moleculares a nível celular e concentrações de moléculas sinalizadoras coordenam essas adaptações (Padilha et al., 2021; Cui et al., 2023).

Embora esteja bem estabelecido que a inatividade física favoreça o quadro inflamatório e alteração da função de células imunológicas, incluindo os monócitos e macrófagos, assim como, no contraponto, a prática regular de exercícios físicos direciona para um ambiente anti-inflamatório, as vias de sinalização intracelulares envolvidas na polarização são parcialmente conhecidas em ambos os cenários. Posto isto, o objetivo da presente Tese de Doutorado foi explorar tais mecanismos intracelulares, em monócitos/macrófagos de indivíduos do sexo masculino, com diferentes faixas etárias e diferentes níveis de ACR. Digno de nota, iremos apresentar dados inéditos na literatura, enfatizando a importância da compreensão dos mecanismos intracelulares envolvidos na resposta imunometabólica de monócitos/macrófagos.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **Inatividade física e baixa ACR, resposta inflamatória e doenças crônicas não transmissíveis**

Muitas doenças crônicas não transmissíveis se tornaram mais comuns e graves porque a civilização moderna nunca evoluiu para ser quase sempre fisicamente inativa (Lieberman, 2015). O conhecimento sobre esta temática não é novo, com evidências milenares sugerindo que a inatividade física é prejudicial à saúde (Simopoulos, 2001; Tipton, 2008). É estimado que o número de passos declinou drasticamente ao longo da história do *homo sapiens*, especialmente após revolução industrial (Booth et al., 2012). Assim, evidências robustas surgiram ao longo das últimas décadas sobre a relação entre a inatividade física e incidência de diferentes doenças e mortalidade (Kokkinos et al., 2011; Lee et al., 2012). Por exemplo, estudo pioneiro de Morris et al. (1953) comparou a incidência de doença cardíaca coronariana entre condutores de ônibus e cobradores em Londres, mostrando que os cobradores, que eram mais fisicamente ativos, apresentavam menor incidência de doenças cardíacas

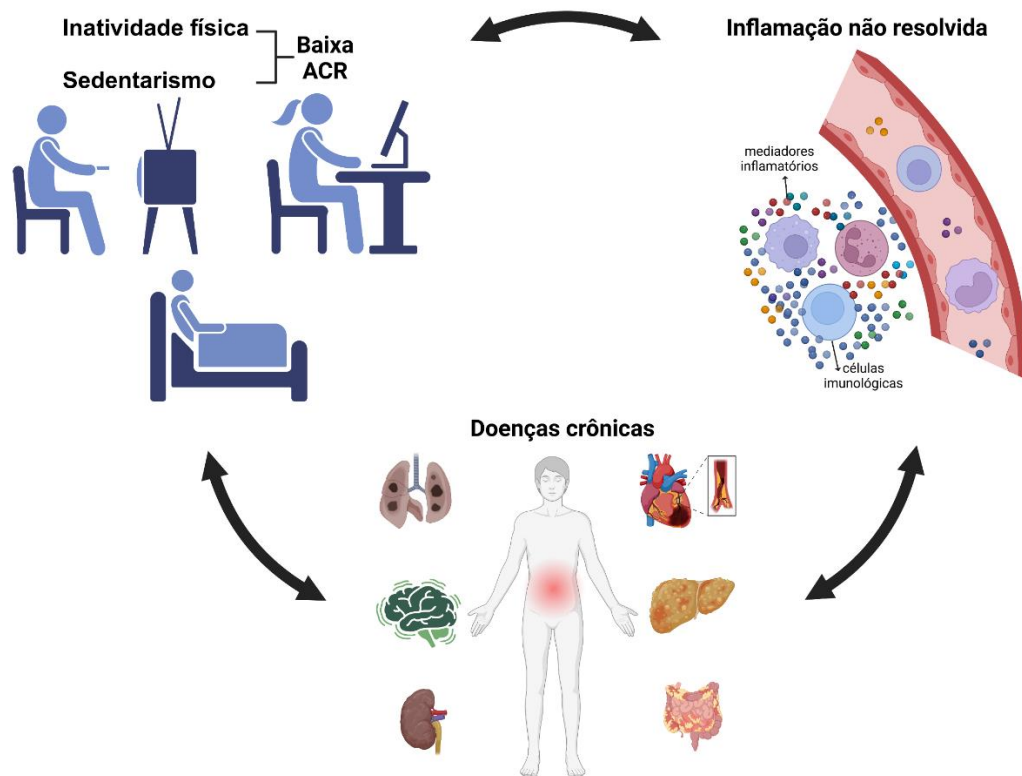
em comparação com os condutores, que permaneciam sentados por longos períodos. Evidências acumuladas posteriormente nortearam o entendimento atual de que a inatividade física está intimamente relacionada com uma série de distúrbios metabólicos, os quais favorecem o desenvolvimento das principais doenças do século XXI (Pedersen, 2009).

A inatividade física pode ser definida pelos níveis de atividade física menores que aqueles requeridos para otimizar a saúde e prevenir morte prematura, como a atual recomendação de no mínimo 150 a 300 minutos semanais de atividade física de intensidade moderada ou 75 a 150 minutos semanais de atividade física de intensidade vigorosa (World Health Organization, 2020). O alto comportamento sedentário, como atividades com baixo gasto energético na posição sentada, reclinada ou deitada, geralmente acompanha a inatividade física e é considerado um fator de risco independente para várias condições de saúde (Tremblay et al., 2017; Park et al., 2020). Uma vez que a ausência/redução do movimento corporal (inatividade física e alto comportamento sedentário) afetam a função dos sistemas fisiológicos, marcadores sensíveis da aptidão física, como a aptidão cardiorrespiratória (ACR), são frequentemente utilizados para determinação da saúde (DeFina et al., 2015). Foi observado que o período rápido/severo de inatividade física, como 20 dias de repouso na cama contínuo ou 2 semanas de redução no número de passos (~10,501 para 1,344), reduziu 27 e 7% da ACR, respectivamente (Saltin et al., 1968; Olsen et al., 2008).

A ACR é definida como a capacidade dos sistemas cardiovascular (coração e vasos sanguíneos) e respiratório (pulmão) de suprir os tecidos periféricos com sangue rico em oxigênio, como nas contrações musculoesqueléticas para a produção de movimento (Kaminsky et al., 2019). Assim, a capacidade do sistema muscular de utilizar o oxigênio para a produção de energia também é relevante para a determinação da ACR (Kaminsky et al., 2019). O padrão ouro para a mensuração da ACR é a quantificação do consumo máximo/pico de oxigênio ( $VO_{2max}$  e  $VO_{2pico}$ , respectivamente), portanto, quanto menor a ACR (ou menor  $VO_{2max}$ ), menor a capacidade dos sistemas fisiológicos previamente mencionados de desenvolver suas funções, no qual está intimamente relacionada com a deterioração

da saúde (Lee, J., & Zhang, 2021). Nesse contexto, o estudo de Lang et al. (2022) analisou 26 revisões sistemáticas com meta-análise representando mais de 20,9 milhões de observações de 199 estudos de coortes únicos, com o objetivo de examinar as evidências sobre a associação da ACR e desfechos de saúde (Lang et al., 2024). Os autores demonstraram que a menor ACR é fator de risco para o desenvolvimento de condições crônicas, como a hipertensão, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, fibrilação atrial, demência e depressão. O mesmo estudo também demonstrou que a ACR é um preditor forte e consistente de risco de diferentes causas de mortalidade na população geral adulta, bem como a maior ACR está associada com melhor prognóstico em populações vivendo com condições crônicas como câncer, insuficiência cardíaca e doenças cardiovasculares.

As doenças crônicas não transmissíveis mais comuns, como doenças cardiovasculares, dislipidemia e diabetes mellitus tipo 2, frequentemente compartilham uma característica, o quadro de inflamação crônica de baixo grau (Cifuentes et al., 2025). Esse estado inflamatório é caracterizado por um aumento persistente, embora com baixa magnitude, nas concentrações séricas de marcadores inflamatórios em repouso, nos quais são indicativos de mortalidade (Candore et al., 2010). Isso inclui o aumento sistêmico, mas não limitado, da interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), proteína C reativa e do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), enquanto é observada diminuição de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 e a adiponectina (Lira et al., 2010). Vale destacar que a inflamação crônica de baixo grau é derivada de processos inflamatórios não resolvidos, ou seja, reações fisiológicas do corpo a danos teciduais locais ou infecções, caracterizadas pelo aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade capilar e migração de células imunológicas para a área afetada (Davies & Hagen, 1997). Assim, a inatividade física e a baixa ACR são acompanhadas por estímulos estressores contínuos, caracterizados pela ativação das células imunológicas e pela liberação de marcadores inflamatórios (Gratas-Delamarche et al., 2014). A manutenção do estímulo estressor impossibilita a resolução do processo inflamatório, tornando-o crônico (**Figura 1**).



**Figura 1.** Relação entre baixa aptidão cardiorrespiratória, inatividade física e alto comportamento sedentário, com processos inflamatórios não resolvidos e desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

Indivíduos com baixa ACR apresentam maior concentração sérica do TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como menor concentração da IL-10 (Hong et al., 2014; Wedell-Neergaard et al., 2018). O aumento crônico do TNF- $\alpha$  e da IL-6, dentre outros mediadores inflamatórios, é associado com quadros de resistência à ação da insulina e constante ativação do sistema imunológico (Glass & Olefsky, 2012), efeitos que são contrarregulados pela ação anti-inflamatória da IL-10 (Dagdeviren et al., 2016; Wan et al., 2020). Em adição ao quadro de resistência à ação da insulina, a elevação crônica das concentrações TNF- $\alpha$  e IL-6 favorece o aumento da lipólise (Aroor et al., 2013). Os lipídeos circulantes, não armazenados no tecido adiposo, são destinados para outros locais, como a camada íntima endotelial, coração, fígado, músculos e pâncreas. Esse quadro é conhecido como acúmulo de gordura ectópica e promove a condição de lipotoxicidade tecidual, prejudicando a capacidade dos tecidos realizarem sua função e tornando-se um dos *links* para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (Glass & Olefsky, 2012). Vale ressaltar que os receptores do TNF- $\alpha$  e IL-6 são encontrados em diferentes tecidos/células e

potencializam o quadro inflamatório devido a ativação de células imunes residentes e indução de outros mediadores inflamatórios (Hirano, 2021; Sethi & Hotamisligil, 2021). Em adição, outros mecanismos são propostos como gatilho do processo inflamatório crônico associado a inatividade física e hipertrofia do tecido adiposo (Di Vincenzo et al., 2024; Cifuentes et al., 2025).

Em conjunto, a associação entre inatividade física/baixa ACR e desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis é marcada pela ativação do sistema imunológico e acompanhada pelo aumento crônico das concentrações de citocinas/marcadores inflamatórios. Dentre as células imunológicas ativadas, os monócitos e macrófagos protagonizam diferentes etapas desse processo.

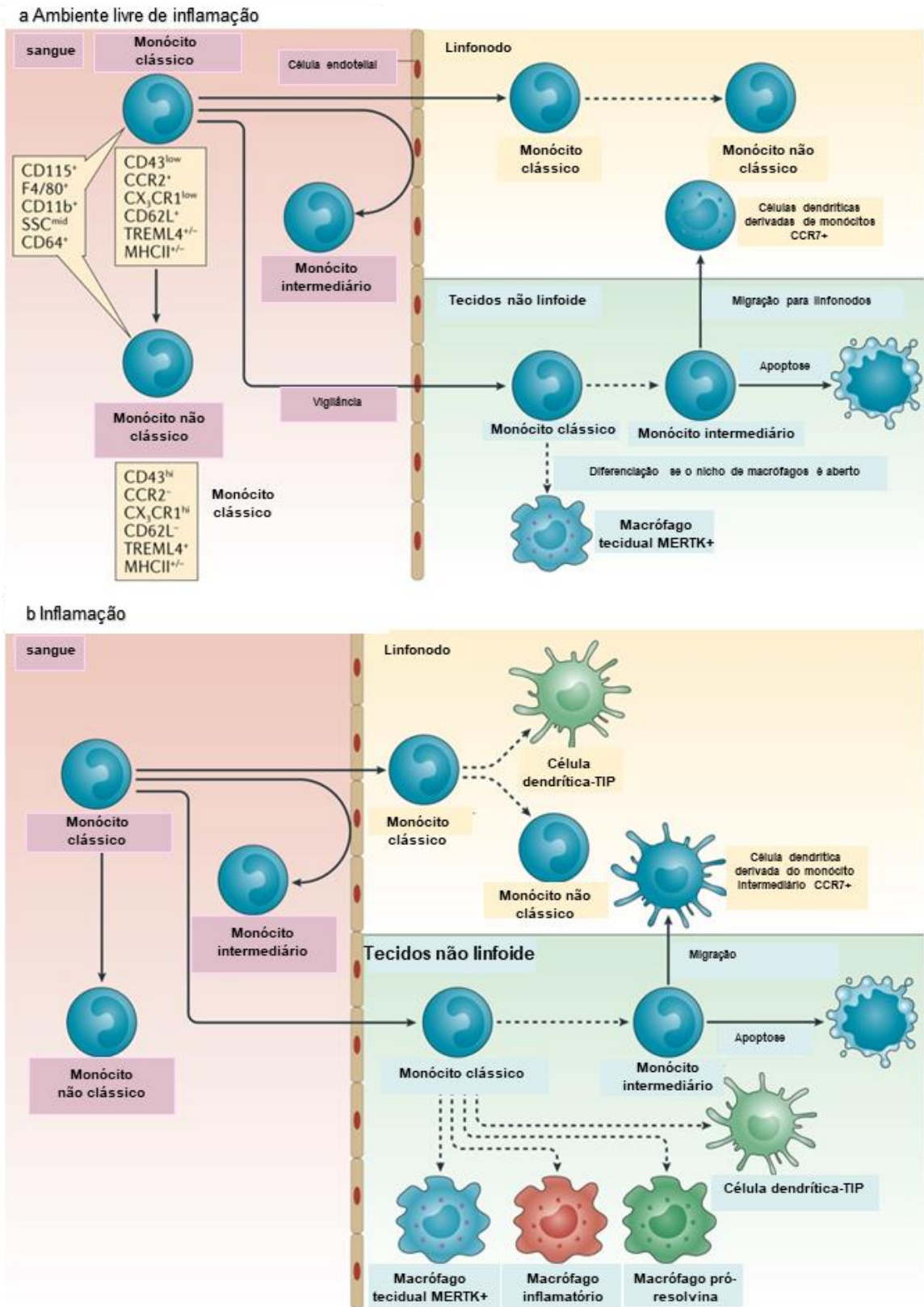
### **Fenótipo e função dos monócitos/macrófagos de acordo com o ambiente inflamatório**

Monócitos são células mononucleares do sistema imunológico inato, desenvolvidos na medula óssea a partir de progenitores mieloides e liberadas na corrente sanguínea (Teh et al., 2019). Na corrente sanguínea, os monócitos atuam como a primeira linha de defesa da resposta imune inata contra patógenos e danos teciduais, exibindo inúmeras funções, como a alta capacidade de migrar para os tecidos, atividade de "patrulhamento" dentro dos vasos sanguíneos, função fagocítica, microbicida, apresentadora de antígeno e de reparo tecidual (Wong et al., 2011). Essas células são normalmente subdivididas em monócitos: a) clássicos (*Cluster* de diferenciação (CD)14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>), b) intermediários (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup>) e, c) não clássicos ou fenótipo de patrulhamento (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup>) (Wong et al., 2011). Outros estudos sugerem subpopulações adicionais e fornecem melhor compreensão da heterogeneidade dos monócitos (Hamers et al., 2019; Wolf et al., 2019).

Os monócitos clássicos compreendem cerca de 90% dos monócitos na circulação de humanos, exibem maior adaptabilidade em resposta a vários estímulos inflamatórios e, frequentemente, demonstram perfil basal mais anti-inflamatório em comparação com outras subpopulações de monócitos (Ong et al., 2018; Olingy et al., 2019; Vishnyakova et al., 2021). Os monócitos intermediários ocupam uma posição de transição entre os monócitos clássicos e não clássicos ao longo

do espectro de maturação, exibindo perfil transcricional mais semelhante aos monócitos não clássicos (Wong et al., 2011). Por outro lado, embora existam descobertas conflitantes em humanos em relação ao potencial inflamatório de monócitos não clássicos (Boyette et al., 2017; Ong et al., 2018; Thaler et al., 2016; Vishnyakova et al., 2021), essa subpopulação demonstra atividade anti-metastática pronunciada em modelo animal (Kubo et al., 2017; Olingy et al., 2019) e sua proporção no sangue é frequentemente associada positivamente a doenças inflamatórias crônicas (Kapellos et al., 2019).

Em situações de estresse tecidual, por exemplo, infecções agudas ou distúrbios metabólicos, agentes quimiotáticos liberados pelas células teciduais promovem a quimiotaxia de leucócitos, dentre eles os monócitos, para o local afetado, mecanismo esse conhecido desde a década de 1950 (Harris, 1953). O processo da resposta inflamatória estimula aumento no recrutamento e diferenciação de monócitos em células dendríticas de tecidos linfóides e não linfóides, a fim de combater possíveis patógenos microbianos por meio da liberação da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), TNF- $\alpha$  e outras moléculas efetoras (Serbina et al., 2003). Outra via discutida frequentemente na literatura é o influxo de monócitos para os tecidos e posterior diferenciação e polarização em macrófagos para a manutenção da homeostase tecidual (Park et al., 2022). A diferenciação de monócitos em macrófagos está relacionada com mudanças conformacionais em seu metabolismo, tamanho e expressão de proteínas (Curi et al., 2017). O fenótipo final do macrófago é regulado pelo microambiente tecidual associado ao fenótipo prévio do monócito diferenciado, apresentando estados de ativação que variam em torno de um amplo espectro marcado pelas extremidades pró-inflamatória e reparadora/anti-inflamatória (Curi et al., 2017) (**Figura 2**).



Nature Reviews | Immunology

**Figura 2.** Recrutamento dos monócitos no contexto basal e inflamatório. Adaptado de Jakubzick et al. (2017).

Embora os termos “pró e anti-inflamatórios” sejam constantemente utilizados na definição dos macrófagos, é importante destacar que essas células apresentam grande heterogeneidade. A década de 90 e início do século XXI foram marcadas por contantes tentativas de definir o estado de ativação dos macrófagos. O termo “ativação alternativa” foi determinado para macrófagos estimulados com IL-4, simplesmente porque o estado de ativação diferia dos macrófagos ativados com interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), denominado ativação clássica (Stein et al., 1992). Mais tarde, a terminologia M1 e M2 foi proposta, devido macrófagos de camundongos C57BL/6 apresentarem metabolismo diferencial da arginina que os macrófagos dos camundongos Balb/c, sendo o primeiro correlacionado com a resposta de células T auxiliares (Th)-1 (liberadoras de IFN- $\gamma$ ) e o segundo com células Th2 (liberadoras de IL-4), ou seja, M1 e M2, respectivamente (Mills et al., 2000). Posteriormente, surgiram tentativas de ampliar a classificação M2 (M2a, b, c, dentre outras) para se adequar às diferentes condições ou ambiente que os macrófagos eram expostos, marcando a variedade de estados de ativação que foram descobertos ao longo do tempo (Stout & Suttles, 2004; Stout et al., 2005; Martinez & Gordon, 2014). Atualmente, sabe-se que os macrófagos exibem plasticidade indeterminada, mesmo no ambiente controlado de cultura celular (por exemplo, após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS)) (Shalek et al., 2013; Avraham et al., 2015; Junkin et al., 2016), e que dicotomias e simplificações devem ser utilizadas com cautela.

No tecido, o fenótipo dos macrófagos (e monócitos atraídos) são modulados por moléculas presentes no microambiente celular, tais como LPS, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-13, glicocorticóides, micro RNAs, substratos energéticos, dentre outros (Wu et al., 2016; Curi et al., 2017). Monócitos e macrófagos estimulados por mediadores pró-inflamatórios (por exemplo, LPS, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) podem expressar, produzir e liberar, embora não limitado como discutido anteriormente, uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1beta( $\beta$ ), IL-12, IL-6, IL-23, TNF- $\alpha$ ) e iNOS para promover ações bactericidas e tumoricidas (Curi et al., 2017). Além disso, outra característica importante dessas células é a alta capacidade de apresentar antígenos e ativar o sistema

imune adaptativo (Jakubzick et al., 2017). Semelhante às células dendríticas, após incorporar e processar os antígenos, monócitos e macrófagos utilizam seu maquinário estrutural para ativar o receptor de células T via complexo de histocompatibilidade principal (MHC) associado ao peptídeo, com interação concomitante de suas moléculas coestimuladoras, como o *cluster* de diferenciação (CD) CD80 e CD86, e liberação de mediadores proteicos para estimular a ativação, expansão clonal e aquisição de atividade efetora das células T (Jakubzick et al., 2017).

Por outro lado, monócitos e macrófagos estimulados com mediadores anti-inflamatórios (por exemplo, IL-10, IL-4 e glicocorticóides) sintetizam citocinas predominantemente anti-inflamatórias, como IL-10, fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o receptor antagonista da IL-1 (IL-1RA), bem como aumentam a expressão de arginase para promover a reparação tecidual e contra regular a resposta pró-inflamatória (resolução da inflamação) (Curi et al., 2017). Dessa forma, o processo de diferenciação e polarização de monócitos/macrófagos é um importante pilar para os mecanismos de defesa imunológica, como a resposta inflamatória inicial e fase resolutive da inflamação associada ao reparo tecidual.

As moléculas no microambiente tecidual que induzem ou contribuem para o fenótipo dos monócitos e macrófagos ativam diferentes vias metabólicas e inflamatórias intracelulares. Agonistas do receptor do tipo *toll-like* 4 (TLR-4), como o LPS, ou mediadores inflamatórios liberados por células T, como o INF- $\gamma$ , desempenham um papel importante na reprogramação metabólica de macrófagos, caracterizada pelo aumento da contribuição do metabolismo glicolítico e pela redução da taxa de fosforilação oxidativa (Van Den Bossche et al., 2017; Stifel et al., 2022;). Um dos mecanismos propostos é a ativação de fatores de transcrição, como o fator induzível por hipóxia do tipo  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), fator nuclear-*kappa* B (NF- $\kappa$ B) e o sinal transdutor e ativador de transcrição do tipo 1 (STAT-1) (Tannahill et al., 2013; Huangfu et al., 2020; Stifel et al., 2022). Por exemplo, após ativação, HIF-1 $\alpha$  e NF- $\kappa$ B se translocam para o núcleo, iniciando a transcrição de genes relacionados a enzimas glicolíticas e citocinas inflamatórias (Tannahill et al., 2013; Kock et al., 2018).

Enzimas reguladoras, como a piruvato quinase M2 (PKM2), são suprarreguladas e contribuem para maior exigência do metabolismo glicolítico (Luo et al., 2011). O complexo 1 do alvo mecanístico da rapamicina (mTORC1) também é ativado pelo LPS e favorece o aumento do fluxo glicolítico por meio da ativação da enzima reguladora hexoquinase 1 (Moon et al., 2015). Curiosamente, além da ação metabólica, a PKM2 e hexoquinase 1 potencializam a resposta inflamatória por diferentes mecanismos. A PKM2 interage com HIF-1 $\alpha$  no núcleo celular e aumenta a expressão de genes inflamatórios e metabólicos orquestrados por esse fator de transcrição (Luo et al., 2011). Por outro lado, a hexoquinase 1 interage com o receptor tipo NOD contendo domínio *pyrin 3* (NLRP3) e contribui para a ativação das caspases e posterior liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Moon et al., 2015). Esses resultados foram corroborados com a supressão da ativação da caspase-1 e da maturação de IL-1 $\beta$  após a inibição de mTORC1 e hexoquinase 1 (Moon et al., 2015), demonstrando, portanto, que vias metabólicas e inflamatórias são necessárias para a resposta imunológica dos macrófagos.

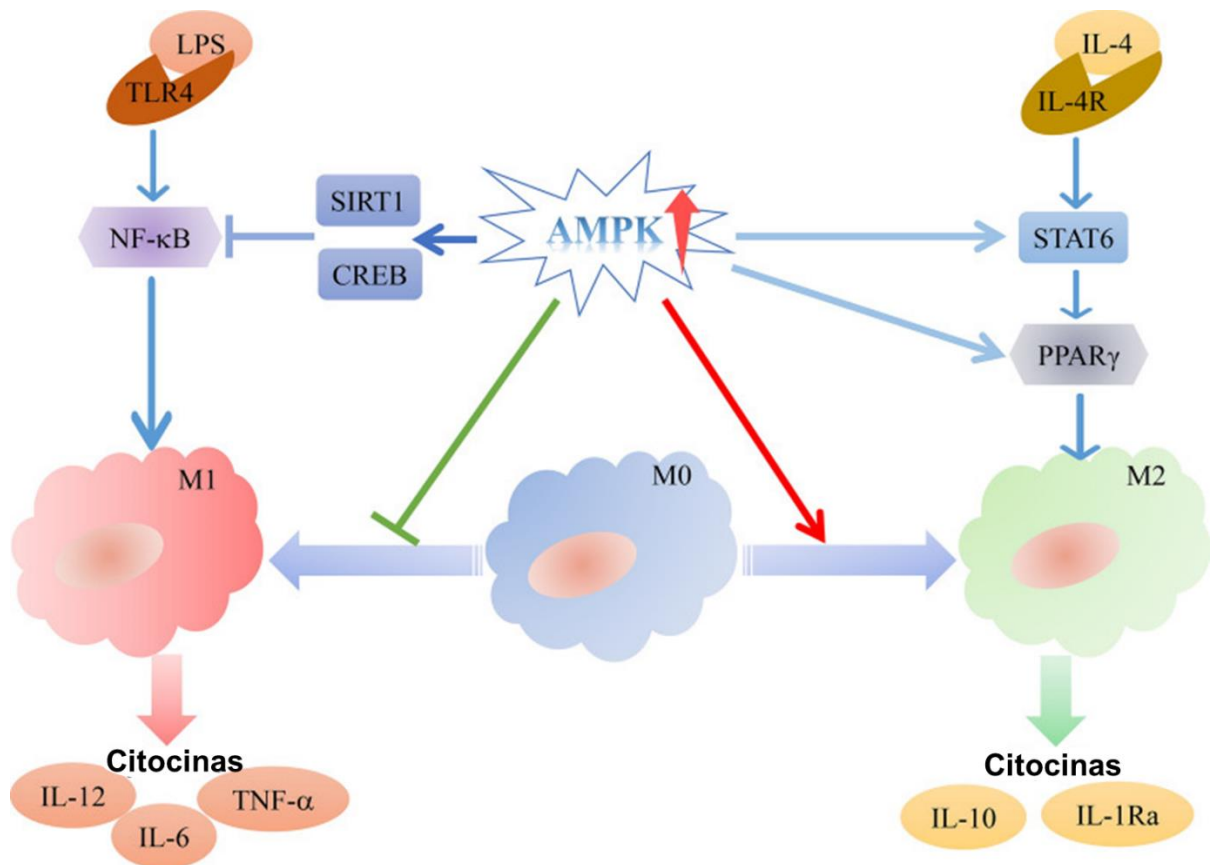
Além disso, a sinalização inflamatória regula positivamente o metabolismo glicolítico de macrófagos de maneira indireta, de modo que a via de sinalização do TLR-4 e do receptor do INF- $\gamma$  estimulam a síntese de iNOS e conseqüente aumento na produção de óxido nítrico e espécies reativas de nitrogênio, no qual são moléculas capazes de reduzir a atividade de todos os complexos contendo ferro e enxofre da cadeia de transporte de elétrons (Thwe & Amiel, 2012; Van Den Bossche et al., 2017). Esse processo contribui para o acúmulo ou utilização alternativa de intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico ou ciclo de Krebs, tais como a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), citrato e succinato (Infantino et al., 2011; Meiser et al., 2016). O citrato é direcionado para a síntese de ácidos graxos para a formação das membranas plasmáticas e a produção de intermediários para a atividade efetora, tais como as prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e itaconato (Infantino et al., 2011; Meiser et al., 2016). O itaconato é um antimicrobiano que também contribui na inibição da cadeia de transporte de elétrons (Infantino et al., 2011; Meiser et al., 2016). Adicionalmente, o succinato estabiliza o HIF-1 $\alpha$  e, dessa forma, potencializa a transcrição de enzimas

glicolíticas e de moléculas inflamatórias, evento esse definido como pseudo-hipóxia (Tannahill et al., 2013). De fato, após estímulo com LPS, macrófagos apresentam intensa redução na atividade da succinato desidrogenase, evento chave para engatilhar o aumento das concentrações do succinato (Stifel et al., 2022). Vale ressaltar que as vias inflamatórias/metabólicas respondem diferencialmente de acordo com o estímulo pró-inflamatório (por exemplo, TLR-2 vs TLR-4) e origem celular, como macrófagos derivados de humanos ou de animais (Lachmandas et al., 2016; Vijayan et al., 2019), portanto, as evidências anteriormente demonstradas devem ser interpretadas com cautela.

Por outro lado, o fenótipo predominantemente anti-inflamatório dos macrófagos geralmente exhibe maior sincronia funcional entre o ciclo de Krebs e a cadeia de transporte de elétrons para a produção de moléculas de adenosina trifosfato, além de frequentemente adquirir maior capacidade de oxidação de ácidos graxos (Van Den Bossche et al., 2017; Wang et al., 2018). Foi demonstrado que o aumento da oxidação de ácidos graxos é orquestrado pela via de sinalização STAT6/coativador 1 $\alpha$  do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos- $\beta$  (PGC-1 $\beta$ ) ou pela ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), no qual são ativados por diferentes fatores anti-inflamatórios, tais como a IL-10 e IL-4 (Ip et al., 2017; Raulien et al., 2017; Vats et al., 2006). O aumento da biogênese mitocondrial e da via de  $\beta$ -oxidação (via AMPK e PGC-1 $\beta$ ) e da expressão de genes anti-inflamatórios (via STAT6 e mediação pela AMPK) são um dos mecanismos propostos para direcionar a programação metabólica para a predominância da fosforilação oxidativa associada ao perfil anti-inflamatório em macrófagos (Zhu et al., 2015; Raulien et al., 2017; Vats et al., 2006).

A AMPK tem sido considerada como um possível regulador mestre da polarização anti-inflamatória de macrófagos (Cui et al., 2023) (Detalhes na **Figura 3**). Foi demonstrado que esse sensor energético inibe a via da mTORC1 (Gwinn et al., 2008) e da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B (Yeung et al., 2004). Adicionalmente, a AMPK ativa a sirtuina 1 (SIRT1) e a proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB), no qual potencialmente estimula a desacetilação e posterior ativação da PGC-1 $\beta$  e aumenta a liberação de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, respectivamente (Sag et al.,

2008; Kelly et al., 2009). De fato, a inibição genética da AMPK em macrófagos inibi a aquisição do fenótipo/função anti-inflamatório, ao passo que a expressão constitutiva diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a liberação da IL-10 (Sag et al., 2008; Galic et al., 2011; Mounier et al., 2013). Outros fatores de transcrição, como a família do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR), também exibem importante função anti-inflamatória. A isoforma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) participa da polarização do fenótipo predominantemente anti-inflamatório dos macrófagos, em partes, pela regulação negativa das vias de sinalização inflamatórias mediadas por fatores de transcrição, como STAT1 e NF- $\kappa$ B, através da competição no mesmo elemento responsivo ao PPAR (Pascual et al., 2005; Zhao et al., 2019).



**Figura 3.** Ação da AMPK na polarização dos macrófagos. Adaptado de Cui et al. (2023).

O aumento na oxidação de ácidos graxos e nas taxas da fosforilação oxidativa no fenótipo anti-inflamatório dos macrófagos não exclui o uso de glutamina e glicose como fontes de carbono para produção energética e processos biossintéticos. Essas moléculas podem ser utilizadas na geração de

adenosina trifosfato e de intermediários metabólicos, como o  $\alpha$ -cetogluturato e a uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNac) (Jha et al., 2015; Liu et al., 2017). O  $\alpha$ -cetogluturato, produzido a partir do metabolismo da glutamina (glutaminólise), suprime a atividade do NF- $\kappa$ B via hidroxilação da proteína fosforilada  $\beta$  inibidora da quinase I *kappa* B (IKK $\beta$ ), regulando negativamente a resposta pró-inflamatória (Liu et al., 2017). O mesmo estudo mostrou que o  $\alpha$ -cetogluturato estimula a polarização de macrófagos anti-inflamatórios por meio da reprogramação metabólica dependente da enzima contendo o domínio *Jumonji-3* (Jmjd3). Adicionalmente, a N-glicosilação, mediada pela UDP-GlcNac, atua na polarização anti-inflamatória através da indução na expressão de marcadores fenotípicos, como o CD206 (receptor de manose) e CD301 (receptor de glicanos) (Jha et al., 2015).

Em conjunto, é notória a grande interação entre vias metabólicas e inflamatórias para definir o fenótipo dos macrófagos. As constantes mudanças no ambiente tecidual permitem que os macrófagos alterem seu metabolismo e função conforme a necessidade, entretanto, o desequilíbrio crônico no fenótipo dessas células, como maior número e proporção do fenótipo pró-inflamatório, é frequentemente apontado como um dos mecanismos causais da inflamação crônica de baixo grau e desenvolvimento de doenças crônicas (Cifuentes et al., 2025). Nesse contexto, uma série de condições clínicas, dentre elas, a obesidade e envelhecimento associados a inatividade física, são acompanhadas por distúrbios no número e fenótipo dos monócitos e macrófagos.

### **Influência da idade, excesso de gordura corporal e leptina no fenótipo e função dos monócitos/macrófagos**

Tem sido demonstrado que o número de monócitos se altera ao longo da vida (Damasceno et al., 2019). Um pico inicial das subpopulações é observado até os primeiros 6 meses de vida, seguido por uma redução até os 8 a 13 anos, e novo aumento na adolescência. O número de monócitos permanece elevado na vida adulta (jovens) e diminui entre os 30 a 50 anos de idade. A partir dos 50 anos de idade, as subpopulações de monócitos aumentam no sangue, o que se hipotetiza refletir os

processos de *turnover* tecidual, apoptose e/ou imunossenescência (Damasceno et al., 2019). De fato, a imunossenescência é uma condição relacionada a mudanças no número e na função de células imunológicas (Kim et al., 2017; Jacinto et al., 2018), e diferentes estudos vêm demonstrando alterações relacionadas à idade nas subpopulações e na função de monócitos.

Monócitos de idosos apresentam aumento da subpopulação não clássica, redução na fagocitose e na expressão do antígeno leucocitário humano classe II - DR (HLA-DR), além de maior liberação basal de citocinas (Seidler et al., 2010; Hearps et al., 2012; Ong et al., 2018). Adicionalmente, foi observada reduzida função mitocondrial associada ao aumento da captação de glicose, e redução na expressão de genes relacionados às proteínas ribossomais, fosforilação oxidativa e transporte de moléculas entre a membrana mitocondrial de monócitos de idosos em comparação com jovens (Saare et al., 2020). Por outro lado, embora o perfil transcricional e a função entre as subpopulações de monócitos de indivíduos jovens e idosos foram similares na condição basal (sem estímulos/patógenos), os monócitos de idosos estimulados com patógenos apresentaram redução do fenótipo associado à defesa contra bactérias e vírus, como uma menor liberação do IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Metcalf et al., 2017). Esses dados são corroborados pela menor resposta contra o vírus Influenza A (Pillai et al., 2016) e pela menor produção da IL-1 $\beta$  estimulada pelo LPS (Sadeghi et al., 1999) dos monócitos de indivíduos mais velhos, reforçando as observações sobre a maior susceptibilidade a infecções dessa população (Meyer, 2010).

Disfunções relacionadas à idade também foram observadas na população de macrófagos em diferentes tecidos. Por exemplo, macrófagos do músculo esquelético apresentaram reduzida expressão de genes relacionados à resposta quimiotática, apresentação de antígeno e marcadores anti-inflamatórios, ao passo que se observou maior expressão de genes relacionados à senescência e inflamação (por exemplo, IL-1 $\beta$ ), além de transportadores de ácidos graxos de cadeia longa (Krasniewski et al., 2022). Outro estudo observou reduzida capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos idosos comparado com os jovens, embora sem diferenças na população

de monócitos e macrófagos derivados da medula óssea (Linehan et al., 2014). Esses dados sugerem que as disfunções relacionadas à idade em monócitos e macrófagos podem depender da origem ou da localização celular.

Por outro lado, macrófagos foram as primeiras células imunes estudadas e relacionadas com a inflamação crônica derivada da obesidade (Xu et al., 2003; Weisberg et al., 2003). Os macrófagos do tecido adiposo apresentam proliferação aumentada na obesidade, em partes, através da proteína quimioatraente de monócitos do tipo-1 (MCP-1) (Amano et al., 2014). Essa quimiocina, dentre outros agentes inflamatórios, também atua na quimiotaxia dos monócitos da corrente sanguínea (Kanda et al., 2006). Indivíduos obesos apresentam fenótipo pró-inflamatório prévio dos monócitos em comparação com indivíduos eutróficos, tornando-os menos susceptíveis à diferenciação/polarização anti-inflamatória após entrarem no tecido adiposo (Bories et al., 2012). Esse processo parece estar relacionado às alterações no ambiente da medula óssea, uma vez que a dieta rica em gordura de curto prazo aumentou o tecido adiposo nesse local, acompanhado pelo aumento de monócitos programados metabolicamente para superior glicólise e fissão mitocondrial, bem como pela redução da fosforilação oxidativa (Boroumand et al., 2022).

O excesso nos estoques de energia, representado pela hipertrofia exacerbada do tecido adiposo, é crucial para o estado de ativação dos macrófagos (Krats et al., 2014). Condições de alta glicose, insulina, ácidos graxos de cadeia longa (principalmente ácido palmítico) e eferocitose de adipócitos mortos estimulam o fenótipo de macrófagos “ativado metabolicamente” (Shapiro et al., 2013; Krats et al., 2014). Com a contínua captação de lipídeos ao longo da expansão do tecido adiposo e a exposição a maiores concentrações de catecolaminas e agentes pró-inflamatórios, o fenótipo “ativado metabolicamente” se torna progressivamente pró-inflamatório, estando associado à resistência à ação da insulina e severidade da obesidade (Priour et al., 2011; Pirzgalska et al., 2017). Dessa forma, enquanto o tecido adiposo eutrófico possui cerca de 10% de macrófagos com fenótipo anti-inflamatório, desenvolvendo atividade sensibilizadora à ação da insulina e de controle da homeostase

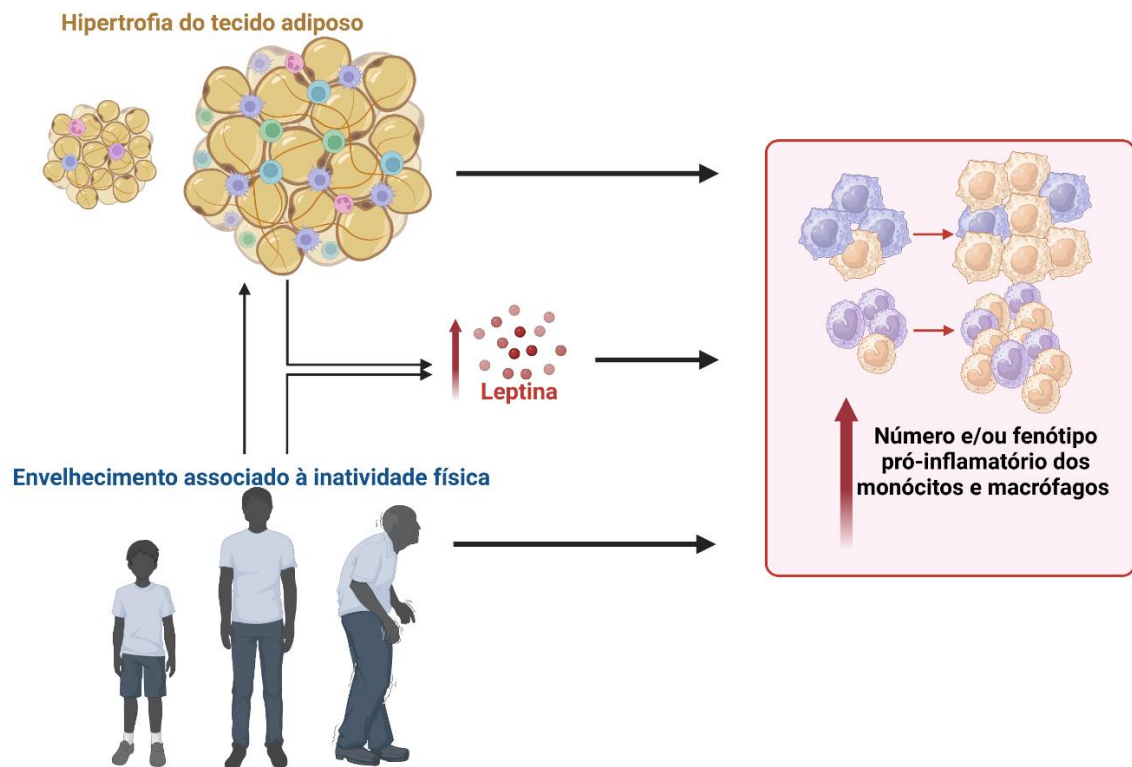
tecidual (Weisberg et al., 2003; Thomas & Apovian, 2017), a hipertrofia do tecido adiposo está predominantemente associada ao fenótipo pró-inflamatório (Weisberg et al., 2003; Thomas & Apovian, 2017). Nesse contexto, macrófagos podem representar cerca de 40% do número total de células no tecido adiposo hipertrofiado de humanos, no qual contribuem fortemente para o aumento de citocinas inflamatórias local e sistêmico (inflamação sistêmica) (Weisberg et al., 2003; Thomas & Apovian, 2017).

Assim, o quadro de resistência à ação da insulina, lipotoxicidade e o desenvolvimento de doenças provindas do quadro da obesidade estão fortemente relacionados com a participação massiva dos macrófagos na resposta inflamatória (Chawla et al., 2011). O desequilíbrio no fenótipo e na proporção dos macrófagos do tecido adiposo na obesidade possui algumas semelhanças com o envelhecimento, uma vez que o aumento do tecido adiposo, no número e no fenótipo pró-inflamatório dos macrófagos, e da inflamação sistêmica são características frequentemente relacionadas ao avanço da idade associado à inatividade física (Camell et al., 2017; Franceschi et al., 2018).

Além do aumento de mediadores inflamatórios sistêmicos, como TNF- $\alpha$  e IL-6, principalmente derivados dos macrófagos do tecido adiposo na obesidade (Weisberg et al., 2003), os adipócitos hipertrofiados suprarregulam adipocinas que participam na coordenação da resposta inflamatória e metabólica do organismo (Tilg et al., 2024). Dentre as adipocinas, a leptina possui grande notoriedade devido a sua capacidade de regular a atividade do sistema imunológico, vias neuroendócrinas hipotalâmicas relacionadas com a diminuição do comportamento alimentar e o aumento do gasto energético, desenvolvimento/função reprodutiva, homeostase energética, entre outras funções (Picó et al., 2022; Münzberg et al., 2024). A liberação da leptina é proporcional ao tamanho do tecido adiposo e estimulada por mediadores inflamatórios e metabólicos associados ao excesso energético e sinais de estresse, como insulina, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Simons et al., 2005; Lee & Fried, 2009; Asterholm et al., 2014).

Em relação à função da leptina em monócitos/macrófagos, esse hormônio estimula a proliferação e ativação dos monócitos circulantes (Santos-Alvarez et al., 1999) e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (Tsiotra et al., 2013). A ligação da leptina em seu receptor de membrana de longa forma (Ob-Rb) estimula vias de sinalização inflamatórias/metabólicas em macrófagos, como a quinase do N-terminal da c-Jun (JNK), STAT3, fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT) e mTORC2, contribuindo para liberação de citocinas pró-inflamatórias (Monteiro et al., 2019; Monteiro et al., 2022). Camundongos alimentados com dieta rica em gordura e com ausência do receptor de leptina na medula óssea apresentaram menor infiltração dos macrófagos no tecido adiposo e aumento do fenótipo anti-inflamatório (Dib et al., 2014). Essas alterações foram acompanhadas por redução do peso e do ambiente inflamatório.

Outro estudo demonstrou que a leptina apresentou ampla ação sobre macrófagos. A programação metabólica e produção de citocinas foi intensificada após estímulo com LPS, ao passo que o aumento na fosforilação oxidativa e nos marcadores fenotípicos de reparo tecidual e cicatrização de ferida também foram maiores com o estímulo de IL-4 (Monteiro et al., 2022). O mesmo estudo demonstrou que a deleção do receptor da leptina Ob-Rb em células mieloides reduziu a resistência à ação da insulina e a inflamação sistêmica na obesidade. Dessa forma, a hiperleptinemia encontrada na obesidade potencializa a atividade pró-inflamatória dos macrófagos e contribui para a perpetuação da inflamação sistêmica e de distúrbios metabólicos (Monteiro et al., 2022) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Impacto da hipertrofia do tecido adiposo, envelhecimento e hiperleptinemia sobre a polarização dos monócitos/macrófagos. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

### **Perfil anti-inflamatório frente a prática regular de exercício físico e maior aptidão cardiorrespiratória**

Enquanto a inatividade física, excesso de gordura corporal e o envelhecimento acompanhado pela inatividade física estimulam aumento na quimiotaxia dos monócitos, número de macrófagos e proporção do fenótipo M1, especialmente no tecido adiposo, a prática regular de exercício físico é uma potente ferramenta para restabelecer a homeostase fenotípica dessas células e, assim, contrarregular o ambiente pró-inflamatório. Apesar da redução dos estoques de gordura corporal ser uma conhecida adaptação anti-inflamatória derivada do maior gasto energético imposto pela contração muscular, os efeitos anti-inflamatórios da prática regular de exercício físico sobre marcadores inflamatórios sistêmicos e o fenótipo de monócitos/macrófagos são independentes de alterações na composição corporal (Dorneles et al., 2019; Čížková et al., 2020; Papagianni et al., 2023). Por exemplo, tem sido

demonstrado menores concentrações sistêmicas de leptina após o período de treinamento combinado (aeróbico e força) ou em indivíduos com alta ACR comparado com baixa ACR, independente dos estoques de gordura corporal (Inoue et al., 2017; Dorneles et al., 2019). De fato, a sessão aguda de exercício físico estimula aumento transiente das catecolaminas, de mediadores anti-inflamatórios e, dependendo do volume/intensidade, do déficit energético, no qual são fatores que reduzem a expressão gênica da leptina no tecido adiposo. Se as alterações na concentração sistêmica são acompanhadas por alterações na função da leptina a nível periférico, como a indução pró-inflamatória em monócitos/macrófagos, ainda é desconhecido.

A sessão aguda de exercício físico, especialmente aeróbico, estimula rapidamente a mobilização de todas as subpopulações de monócitos (majoritariamente as citotóxicas) na corrente sanguínea, com posterior redução poucos minutos após a finalização da sessão (Graff et al., 2018; Batatinha et al., 2023). Após o término, os monócitos clássicos mobilizados exibem enriquecimento de genes relacionados à apresentação e processamento de antígenos, citotoxicidade, responsividade a citocinas, metabolismo de ácidos graxos, transporte de vitaminas e defesa antiviral. Em contraste, monócitos não clássicos mostram enriquecimento em genes relacionados à ativação e proliferação de células T, migração e quimiotaxia, e responsividade a citocinas, carboidratos e hormônios (Batatinha et al., 2023). Além disso, a sessão de exercício aeróbico tem sido eficaz no aumento da capacidade fagocítica e microbicida dos monócitos (Gálvez et al., 2020), na supressão transitória dos efeitos anti-inflamatórios da IL-10 e IL-6 dos monócitos CD14<sup>+</sup> (Islam et al., 2024) e na diminuição na liberação de IL-10 e IL-6, associada ao aumento na liberação do TNF- $\alpha$ , de PBMCs após desafio inflamatório com LPS (Slusher et al., 2018). Essas descobertas sugerem que o exercício físico prepara os monócitos para uma resposta rápida ao estresse.

O *primer* inflamatório é transiente, visto que monócitos polarizados para o fenótipo pró-inflamatório (LPS+IFN- $\gamma$ ) ou anti-inflamatório (IL-10) apresentaram leve fenótipo anti-inflamatório 24 horas após sessão de exercício aeróbico em jovens saudáveis (Islam et al., 2024). De fato, o

treinamento físico aumenta a polarização de macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório em diferentes tecidos, como no tecido adiposo (Dieli-Conwright et al., 2018; Kolahdouzi et al., 2019; Baek et al., 2020), muscular (Walton et al., 2019; Luo et al., 2021) e hepático (Zhenyu et al., 2013). Corroborando com esses resultados, Voskoboynik et al. (2024) conduziram uma metanálise compreendendo 75 conjuntos de dados sobre exercício físico e redução do movimento corporal, com mais de 7.000 amostras, com o objetivo de avaliar o impacto da prática de exercício físico sobre a polarização dos monócitos/macrófagos. Os autores verificaram que a sessão aguda de exercício físico aumenta a polarização de macrófagos para o fenótipo mais pró-inflamatório, enquanto o treinamento à longo prazo estimula a transição para o fenótipo anti-inflamatório, independentemente do tipo de exercício, espécie avaliada e métodos para obter as células.

O impacto do período de treinamento físico sobre o perfil anti-inflamatório dos monócitos e macrófagos vem sendo corroborado em estudos com indivíduos com diferentes *status* de ACR. Embora a obesidade aumente a proporção de monócitos CD16<sup>+</sup>, indivíduos jovens com obesidade e maior ACR apresentaram diminuição dessa subpopulação comparado com seus pares com baixa ACR (Dorneles et al., 2019). Adicionalmente, os monócitos de indivíduos jovens eutróficos com alta ACR apresentaram maquinário gênico propício para a ativação do PPAR- $\gamma$ , comparado com seus pares com baixa ACR (Antunes et al., 2020). A respeito dos macrófagos, foi observado que mulheres idosas (62 a 80 anos) com maior ACR expressam menor proporção de macrófagos positivos para o CD36 ou CCR2 no tecido adiposo subcutâneo, quando excluído os efeitos da massa de gordura, em comparação com mulheres com menor ACR (Čížková et al., 2020). O mesmo estudo demonstrou que o conteúdo de macrófagos positivos para o CD11c e CD163 (marcador fenotípico anti-inflamatório) foi maior nas mulheres com alta ACR quando não ajustado pela massa de gordura. As mudanças fenotípicas apresentadas foram acompanhadas pela redução do perfil inflamatório e melhora de parâmetros metabólicos (Dorneles et al., 2019; Čížková et al., 2020; Antunes et al., 2020).

Membros da família do PPAR, especialmente o PPAR- $\gamma$ , exibem importante função na mudança fenotípica de macrófagos mediada pelo exercício físico (Yakeu et al., 2010; Silveira et al., 2016). Por exemplo, a sessão de exercício físico induz aumento de ligantes e ativação do PPAR- $\gamma$  em monócitos, enquanto o período de treinamento físico aumenta a expressão associada ao fenótipo anti-inflamatório dos monócitos/macrófagos (Yakeu et al., 2010; Thomas et al., 2012; Ruffino et al., 2016; Silveira et al., 2016). Esses dados são corroborados pela indução do fenótipo anti-inflamatório dos macrófagos por diferentes agonistas do PPAR- $\gamma$ , bem como a associação entre a ativação desse fator de transcrição/sensor energético e a redução de distúrbios inflamatórios/metabólicos (Yu et al., 2023). Por outro lado, embora seja notória a participação do PPAR- $\gamma$  no perfil anti-inflamatório de macrófagos, nosso grupo demonstrou que a deleção condicional em macrófagos/células mielóides retardou parcialmente o fenótipo anti-inflamatório mediado pelo treinamento aeróbio (Silveira et al., 2019; Silveira et al., 2020), evidenciando a complexidade dos circuitos metabólicos/inflamatórios e participação de outras moléculas efetoras.

Como revisado anteriormente, a AMPK é outro sensor energético com ampla função na programação metabólica e indução para o fenótipo anti-inflamatório dos monócitos e macrófagos. Diferentes agonistas da AMPK estimulam a polarização dos monócitos e macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório, com efeitos benéficos no perfil inflamatório sistêmico, sensibilidade à ação da insulina e desordens lipídicas (Feng et al., 2021; Cui et al., 2023). A AMPK coordena vários processos intracelulares nessas células, como a autofagia (Ou et al., 2018), rotas metabólicas (Steinberg & Schertzer, 2014) e vias de sinalização inflamatória (Cui et al., 2023), pontuando sua localização/importância na intersecção das vias metabólicas e inflamatórias (Cui et al., 2023).

Por outro lado, a participação da AMPK na polarização dos monócitos e macrófagos, frente a prática regular de exercício físico, ainda é fruto de investigações. A AMPK é ativada em monócitos/macrófagos por diferentes moléculas que geralmente são moduladas pela sessão de exercício físico (Cai et al., 2022; Caratti et al., 2023; Chan et al., 2015; Davies et al., 2015; Elfeky et

al., 2016; Lee et al., 2020; Steinberg & Hardie, 2023; Wan et al., 2014; Xiong et al., 2018; Zhu et al., 2015). Nesse contexto, a literatura apresenta resultados conflitantes sobre o estado de fosforilação da AMPK em monócitos após sessão aguda de exercício aeróbio, com relatos de redução na fosforilação imediatamente após (Moir et al., 2008; Moir et al., 2010), aumento da fosforilação, particularmente da via *downstream*, imediatamente após (Fuller et al., 2017) ou ausência de alteração 3 horas depois (Davies et al., 2015). Em relação ao treinamento físico, macrófagos do tecido adiposo visceral apresentaram enriquecimento da expressão de genes da via da AMPK após período de treinamento aeróbio (Qin et al., 2024), ao passo que foi observado menor expressão gênica da AMPK em monócitos estimulados de indivíduos jovens com alta ACR, treinados aerobiamente, comparado com indivíduos com baixa ACR (Antunes et al., 2020-1; Antunes et al., 2020-2). Adicionalmente, o estudo de Calderin et al. (2022) observou que o treinamento físico aumentou a liberação de mediadores lipídicos pró-resolvinas, no qual induziram respiração mitocondrial em macrófagos. Os autores sugeriram que o aumento da respiração mitocondrial, estimulada pelas moléculas pró-resolvinas, foi dependente da AMPK em experimentos *in vitro*, embora não comprovaram o impacto causal do treinamento físico sobre esse sensor energético.

Em conjunto, as diferentes observações na atividade ou expressão da AMPK podem estar relacionadas com o mecanismo previamente discutido de *primer* pró-inflamatório após sessão aguda de exercício, com posterior efeito anti-inflamatório da prática regular de exercício físico, sobre o fenótipo de macrófagos. Em adição, a análise de diferentes subpopulações de monócitos em conjunto, forma de obtenção dos macrófagos e os métodos de mensuração da participação da AMPK dificultam as interpretações sobre o estado de ativação ou o impacto da ativação desse sensor energético no direcionamento do fenótipo de monócitos/macrófagos em resposta a prática regular de exercício físico.

## JUSTIFICATIVA

A inatividade física e concomitante menor ACR, especialmente associadas ao aumento nos depósitos de gordura, são intimamente relacionadas com a inflamação crônica de baixo grau e distúrbios metabólicos, que por sua vez aumentam os riscos para o desenvolvimento de diferentes doenças crônicas não transmissíveis. A instalação de doenças crônicas não transmissíveis está fortemente relacionada ao aumento dos gastos públicos com saúde, com a redução da qualidade de vida e da capacidade de trabalho.

A população de monócitos e macrófagos respondem aos diferentes sinais de estresse e alteram seu fenótipo para a promoção de respostas inflamatórias e de reparações via resposta anti-inflamatória. O quadro inflamatório crônico está intimamente relacionado a predominância do fenótipo pró-inflamatório dos monócitos e macrófagos, no qual participam efetivamente do início e manutenção desse ambiente. Por outro lado, o treinamento físico regular favorece o ambiente anti-inflamatório, em partes, através da polarização de monócitos e macrófagos para fenótipos mais anti-inflamatórios.

Dentre os mecanismos intracelulares propostos que possibilitam a polarização de monócitos e macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório, a AMPK é conhecida como forte regulador. A AMPK coordena vias metabólicas e inflamatórias dos monócitos e macrófagos, no qual possibilita a regulação da atividade de diferentes fatores de transcrição, enzimas metabólicas e organelas, culminando na alteração da função dessas células. Por outro lado, permanece não clara a participação da AMPK na polarização dos monócitos/macrófagos mediada pela prática regular de exercício físico ou de acordo com o *status* de treinamento físico, evidenciando a necessidade de pesquisas.

Outro mecanismo anti-inflamatório da prática regular de exercício físico é a redução sistêmica de moléculas pró-inflamatórias, dentre elas, a leptina. A leptina possui atividade predominantemente pró-inflamatória em monócitos e macrófagos, portanto, a redução nas concentrações desse hormônio contribui indiretamente para o equilíbrio fenotípico no contexto inflamatório crônico, como a redução da mobilização dos monócitos e polarização para o fenótipo mais pró-inflamatório. Entretanto, a

função a nível celular de diferentes mediadores inflamatórios é dependente de contexto (Islam et al., 2021; Islam et al., 2024), dessa forma, é desconhecido se a ação da leptina na polarização dos monócitos/macrófagos difere de acordo com o *status* de treinamento.

Em conjunto, o conhecimento a respeito da função de moléculas mediadoras da polarização de monócitos/macrófagos, derivadas do ambiente imposto pela prática regular de exercício físico, é importante para o desenvolvimento de estratégias anti-inflamatórias a nível celular. Adicionalmente, evidências sobre a ação anti-inflamatória da prática regular de exercício físico fortalecem a importância de introduzi-lo e realizá-lo ao longo da vida.

No presente estudo, o termo polarização “like-M1” e “like-M2” será utilizado para monócitos polarizados para o fenótipo pró-inflamatório ou anti-inflamatório, respectivamente.

## **OBJETIVO GERAL**

Analisar o impacto da ativação da AMPK sobre a polarização de monócitos para o fenótipo “like-M1” e “like-M2” de acordo com o *status* da ACR e idade (objetivo 1). Adicionalmente, examinar a ação da leptina durante a polarização de monócitos para o fenótipo “like-M1” e “like-M2” de acordo com o *status* da ACR (objetivo 2).

### **Objetivos específicos**

Analisar o fenótipo dos monócitos polarizados, como a produção de citocinas e expressão gênica, na ausência ou presença da AMPK e leptina em indivíduos com baixa ou alta ACR.

Desenvolver subanálises para explorar o impacto da ACR sobre a polarização dos monócitos, na ausência ou presença da AMPK, de acordo com a idade (Subgrupos: Jovens Baixa-ACR vs Jovens Alta-ACR vs Meia idade-Alta ACR).

Caracterizar os subgrupos Jovens Baixa-ACR, Jovens Alta-ACR, Meia idade-Alta ACR quanto a ingestão alimentar, composição corporal, nível de atividade física, comportamento sedentário e soropositividade para infecção viral crônica.

Explorar o impacto da ACR sobre a composição de células imunológicas na corrente sanguínea (citometria de fluxo) e resposta inflamatória das PBMCs (cultura das PBMCs) e das células no sangue periférico (sangue total estimulado com LPS) dos subgrupos Jovens Baixa-ACR, Jovens Alta-ACR, Meia idade-Alta ACR.

## **HIPÓTESE DO ESTUDO**

Hipótese alternativa: A função da AMPK e leptina durante a polarização dos monócitos, bem como a resposta inflamatória e metabólica, são dependentes do *status* da ACR.

Hipótese nula: A função da AMPK e leptina durante a polarização dos monócitos, bem como a resposta inflamatória e metabólica, não são dependentes do *status* da ACR.

## **MÉTODOS**

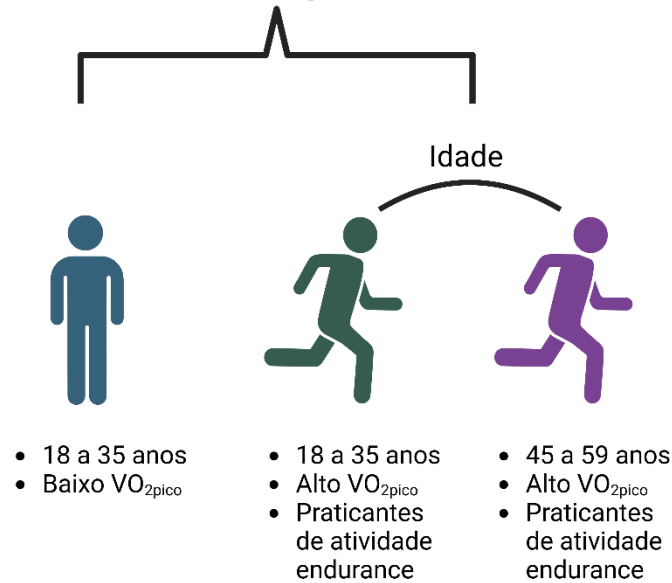
### **Participantes e design do estudo**

Foi realizado um estudo transversal, no qual foram recrutados indivíduos adultos do sexo masculino, aparentemente saudáveis, com idade entre 18 e 35 (jovens) e 45 a 59 (meia idade) anos. Os critérios de não inclusão utilizados foram: 1) Uso de cigarro (tabagismo), 2) histórico ou diagnóstico de doenças/complicações cardiovasculares (por exemplo, infarto agudo do miocárdio), metabólicas (por exemplo, Diabetes *Mellitus* Tipo 2) ou qualquer outra condição de doença que potencialmente alterasse a resposta das variáveis estudadas, 3) limitações musculoesqueléticas que dificultassem a realização das avaliações do estudo, 4) uso de remédios que modulassem as variáveis estudadas, 5) idade fora da faixa definida e 6) pessoas do sexo feminino. Os voluntários foram selecionados após

demonstrarem interesse em participar do estudo por meio do preenchimento de um formulário online divulgado nas redes sociais. O formulário foi composto por perguntas necessárias para verificação imediata dos critérios de não inclusão definidos. Posteriormente, um primeiro contato foi realizado a partir do *WhatsApp* para confirmação do interesse em participar da pesquisa e agendamento da primeira visita.

A primeira visita foi realizada no Laboratório de Fisiologia Celular do Exercício (LaFiCE), localizado na UNESP de Presidente Prudente, para assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (CAAE: 93417018.1.0000.5402), realização da familiarização na esteira e avaliação da ACR através da determinação do  $VO_{2\text{pico}}$  em um teste incremental na esteira. Após finalização da avaliação, os voluntários eram conscientizados a ir embora, aguardar o resultado, e informados que o nível da ACR seria determinante para continuação ou não na pesquisa. Um integrante da pesquisa foi responsável por quantificar a ACR e entrar em contato com o voluntário para o retorno. Foram mantidos na pesquisa, e convidados para a segunda visita, os voluntários jovens treinados aerobiamente que apresentaram  $VO_{2\text{pico}}$  abaixo ou acima dos valores previamente publicados por nosso grupo ( $\sim < 46$  ou  $> 54 \text{ mL.kg.min}^{-1}$ ) (Antunes et al., 2020-1). Valores próximos dessas faixas evidenciaram substanciais diferenças na resposta/fenótipo inflamatório de monócitos de acordo com a ACR (Antunes et al., 2020-1; Antunes et al., 2020-2). Adicionalmente, voluntários com meia idade, também treinados aerobiamente, foram mantidos no estudo quando o  $VO_{2\text{pico}}$  foi classificado como excelente de acordo com a Classificação da ACR Brasileira (Herdy & Caixeta, 2016), embora ainda apresentaram ACR semelhante aos indivíduos jovens com alta ACR (ver seção dos resultados). Os voluntários convidados para a segunda visita foram divididos em dois grupos para as comparações principais: 1) Pessoas com alta ACR ( $n = 12$ ) e 2) Pessoas com baixa ACR ( $n = 15$ ). Adicionalmente, subanálises visando o impacto da ACR no perfil inflamatório, de acordo com a idade, foram desenvolvidas com 3 subgrupos: 1) Jovens Baixa-ACR ( $n = 12$ ), 2) Jovens Alta-ACR ( $n = 8$ ) e 3) Meia idade-Alta ACR ( $n = 7$ ) (**Figura 5**).

## Efeito da Aptidão Cardiorrespiratória



**Figura 5.** Grupos experimentais. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

A segunda visita foi novamente agendada no LaFiCE pelo período da manhã, com intervalo mínimo de 2 dias e máximo de 5 dias após a primeira visita. Os voluntários foram conscientizados a manter jejum *overnight* de no mínimo 10 horas e evitarem esforços físicos (por exemplo, prática de exercício físico ou atividades intensas) 24 horas antes da visita. Chegando ao LaFiCE, os voluntários permaneceram sentados para a coleta do sangue em jejum, no qual foi destinado para todos os experimentos com amostra biológica do estudo. Posteriormente, uma integrante da pesquisa aplicou o questionário para determinação do nível de atividade física (Questionário Internacional de Atividade Física - IPAC). A integrante também explicou em detalhes como o voluntário deveria preencher o registro alimentar, que deveria ser preenchido em três dias da semana e com início naquela mesma semana da coleta de sangue. Após finalização das instruções, o voluntário foi encaminhado para a sala 98 do Departamento de Educação Física, onde a avaliação da composição corporal foi realizada pelo

método absorciometria de raios-X de dupla energia (DEXA), por um integrante da pesquisa capacitado para a realização.

### **Avaliação da ACR**

Os participantes foram submetidos a um teste incremental máximo na esteira (LX160i - Movement) para determinação do  $VO_{2\text{pico}}$ . O teste foi iniciado com aquecimento de 5 minutos a 5 Km/h. Após o aquecimento, a velocidade foi aumentada para 6 Km/h para indivíduos que não praticavam exercício físico aeróbio, ou 8 Km/h para indivíduos que praticavam exercício físico aeróbio. Posteriormente, houve incrementos de 1 Km/h a cada 2 minutos até a exaustão voluntária do participante. A percepção subjetiva de esforço foi monitorada pela escala de Borg no início da avaliação, final de cada estágio (anterior ao incremento da velocidade) e final da avaliação. O consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) foi mensurado durante toda a avaliação pelo analisador de gases (Quark PFT; Cosmed, Roma, Itália) respiração-a-respiração. O  $VO_{2\text{pico}}$  foi assumido pela maior média dos últimos 30 segundos observada durante o final da avaliação. A confirmação do  $VO_{2\text{pico}}$  foi realizada a partir dos seguintes critérios: 1) relação de troca gasosa maior que 1.1, 2) percepção subjetiva de esforço determinada pela escala de Borg maior que 18 na escala de 6 a 20 ou 3) platô do  $VO_2$  entre os últimos estágios do teste (Cabral-Santos et al., 2016; Gerosa-Neto et al., 2020).

### **Antropometria e avaliação da composição corporal**

A estatura foi medida por meio de um estadiômetro com escala métrica com precisão de 0,1 cm e base fixada ao solo (Sanny®, São Paulo, Brasil). Para a análise da composição corporal, foi utilizado o DEXA (Milliken; Going & Lohman, 1996). O método fraciona o corpo em três compartimentos anatômicos para mensuração da massa de gordura, massa livre de gordura e conteúdo mineral ósseo. A radiação experimentada pelo indivíduo é menor que 0,05 milirem, equivalente a 50 vezes menor que a utilizada em um exame tradicional de raio X.

### **Registro alimentar e IPAC**

Os voluntários foram orientados a iniciar a realização do registro alimentar na semana da coleta de sangue afim de monitorar o consumo alimentar. O consumo alimentar foi verificado por meio de diário alimentar, no qual os voluntários foram instruídos a registrar detalhadamente os alimentos e bebidas consumidos, utilizando medidas caseiras ou gramas, com a recomendação de realizar o registro imediatamente após a ingestão. O registro alimentar foi preenchido em dois dias no meio da semana e um dia no final de semana. O dia preenchido no final de semana foi fixo (sábado) e os dias do meio de semana deveriam ser alternados (por exemplo, segunda e quinta). Os voluntários também foram orientados a manter a rotina nutricional. Para o cálculo das calorias, macro e micronutrientes foi utilizada a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Os produtos alimentares que não estavam presentes na TBCA, foram adicionados de acordo com informações do fabricante (Pereira & Sichieri, 2007).

O IPAC foi aplicado presencialmente por uma integrante da pesquisa capacitada. As informações foram utilizadas para a determinação do tempo associado ao comportamento sedentário e tempo destinado em atividades físicas de intensidade leve, moderada, vigorosa, bem como a quantificação do tempo em atividades físicas de intensidade moderada/vigorosa (Craig et al., 2003).

### **Coletas de sangue**

Aproximadamente 35 mililitros de sangue foram coletados em repouso, nas dependências do LaFiCE, por uma enfermeira experiente. O volume foi dividido em tubos contendo trissódio etilenodiamino tetraacetato de potássio (K3-EDTA), tubos secos (com ativador de coágulo) e tubos com fluoreto de sódio/K3-EDTA. As coletas foram realizadas pela punção periférica da veia do antebraço. Posteriormente, as amostras de sangue foram divididas para a análise de parâmetros metabólicos e inflamatórios do sangue, separação das PBMCs, ensaio do sangue total estimulado e isolamento dos monócitos CD14+CD16- periféricos.

### **Análise de parâmetros sanguíneos**

Para análise das variáveis sanguíneas, os tubos de sangue foram centrifugados a 2500 g por minuto por 15 minutos a 4 °C. A porção líquida separada (plasma ou soro) foi pipetada em microtubos de polipropileno e armazenada a temperatura de -80°C para posterior análise. As dosagens do perfil lipídico, tais como triacilglicerol e colesterol total, bem como a determinação das concentrações de glicose, foram realizadas pelo método colorimétrico com kits da empresa Labtest (Labtest®, Brasil). As concentrações de adiponectina, leptina, IFN- $\gamma$ , MCP-1, PAI-1 e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) foram determinadas, com o soro dos voluntários, pelo ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) com kits obtidos da empresa de R&D (DuoSet-Minneapolis, EUA). As concentrações de insulina e cortisol foram analisadas a partir do ELISA com kits da Monobind (Monobind Inc., USA). A determinação do soro-*status* de anticorpos IgG para os vírus citomegalovírus (CMV) e herpes-simplex 1 e 2 (HSV 1 e 2) foi realizada via ELISA com kits da Euroimmun (Luebeck, Alemanha). Por fim, o cálculo do modelo de homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) foi realizado usando a equação:  $HOMA-IR = (glicose [mmol/L] \times insulina [\mu IU/mL]) / 22,5$  (Geloneze et al., 2006).

### **Ensaio do sangue total estimulado**

O ensaio do sangue total estimulado foi realizado baseado no protocolo proposto anteriormente (Barry et al., 2018). Foi utilizado 1 mL de sangue venoso coletado em tubo contendo K3-EDTA de cada voluntário. O sangue foi diluído na proporção de 1:10 com o meio *Medium Roswell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640) (Sigma-Aldrich Co., LLC), pré-aquecido a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, livre de soro e contendo penicilina [100 U/mL] e estreptomicina [0,1 mg/mL]. O sangue diluído de cada voluntário foi pipetado em 6 poços da placa de cultura de 24 poços (Kasvi, PR, Brasil), no volume de 540  $\mu$ L/poço, e 3 desses poços foram tratados/estimulados com 0,6  $\mu$ L da concentração estoque do LPS (*Escherichia coli*, tipo: 0111: B4; Sigma, St. Louis, MO), com concentração final nos poços de 10 ng/mL. Posteriormente, os poços tratados com LPS foram preenchidos com 59,4  $\mu$ L e os poços controle

(sem LPS) com 60  $\mu$ L do meio RPMI-1640 usado anteriormente para alcançar o volume final de 600  $\mu$ L/poço. Os poços foram homogeneizados adequadamente e incubados por 6 horas em incubadora com temperatura de 37°C e concentração de 5% CO<sub>2</sub>. Após incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado em microtubos de polipropileno a -80°C para posterior análise. As análises das concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  foram realizadas pelo ELISA com kits DuoSet da empresa R&D (Minneapolis, EUA).

### **Separação das PBMCs e citometria de fluxo**

Foi manipulado em torno de 9 mL de sangue venoso de cada voluntário, coletado em tubos contendo K3-EDTA, para a separação das PBMCs. As células foram isoladas do sangue por meio da técnica de separação por gradiente de densidade. Para isso, o sangue coletado foi adicionado em tubos que continham histopaque (Histopaque – 1077. Sigma-Aldrich Co. LLC) na proporção de 1:1 e centrifugado por 30 minutos a 400 x g em uma centrífuga sem freio, a fim de estimular a sedimentação dos eritrócitos e separação das PBMCs. As PBMCs foram lavadas/centrifugadas em solução salina e o *pellet* foi suspenso em 1 mL de soro bovino fetal frio (2 a 8°C). Posteriormente, 20  $\mu$ L do meio com as células foi misturado em 380  $\mu$ L de Azul de Tripán para determinação do número de células na Câmara de Neubauer. Após contagem, aproximadamente 3 milhões de PBMCs ( $3 \times 10^6$ ) foram armazenadas em microtubos de criopreservação, com 10% de dimetilsulfóxido e 90% de soro bovino fetal frio, no volume final de 1 mL. O meio com as PBMCs foi congelado progressivamente com *Mr. frosty* (Thermo Fisher Scientific) dentro do freezer -80 graus e mantido congelado nessa temperatura para análises futuras (Olean-Oliveira et al., 2023).

As PBMCs foram descongeladas em aproximadamente 4 meses após o congelamento para realização da citometria de fluxo. O descongelamento seguiu os seguintes passos: 1) Rápido descongelamento (< 5 minutos) na temperatura de 37°C do microtubo de criopreservação contendo as PBMCs congeladas, 2) inserção de 1 mL de RPMI-1640+20% de soro bovino fetal, pré-aquecido a 37°C, dentro do tubo de criopreservação e posterior passagem de todo o volume para um tubo de

polipropileno, com capacidade de 15 mL, contendo 10 mL de RPMI-1640+20% de soro bovino fetal também pré-aquecido, 3) centrifugação das células a 400g por 10 minutos, 4) retirada cuidadosa do sobrenadante, ressuspensão das células com o mesmo meio e centrifugação com as mesmas configurações da primeira centrifugação (passo 3), e 5) suspensão do pellet com RPMI-1640.

A técnica da citometria de fluxo foi utilizada para caracterização (fenotipagem) dos monócitos e linfócitos. Para a fenotipagem, as PBMCs ( $2 \times 10^5$ ) foram marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos específicos para as seguintes proteínas de membrana: 1) CD14 e CD16 para determinação das subpopulações dos monócitos, 2) C3, CD4 e CD8 para a determinação das subpopulações de linfócitos T, 3) CD56 e CD16 para a determinação das subpopulações de células *natural killers* (NK) e 4) HLA-DR, CD11b, CD80, receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7) e proteína de morte celular programada 1 (PD-1) para determinação do estado de ativação/função das células, especialmente das subpopulações dos monócitos. As análises foram realizadas no citômetro FACSymphony (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canadá).

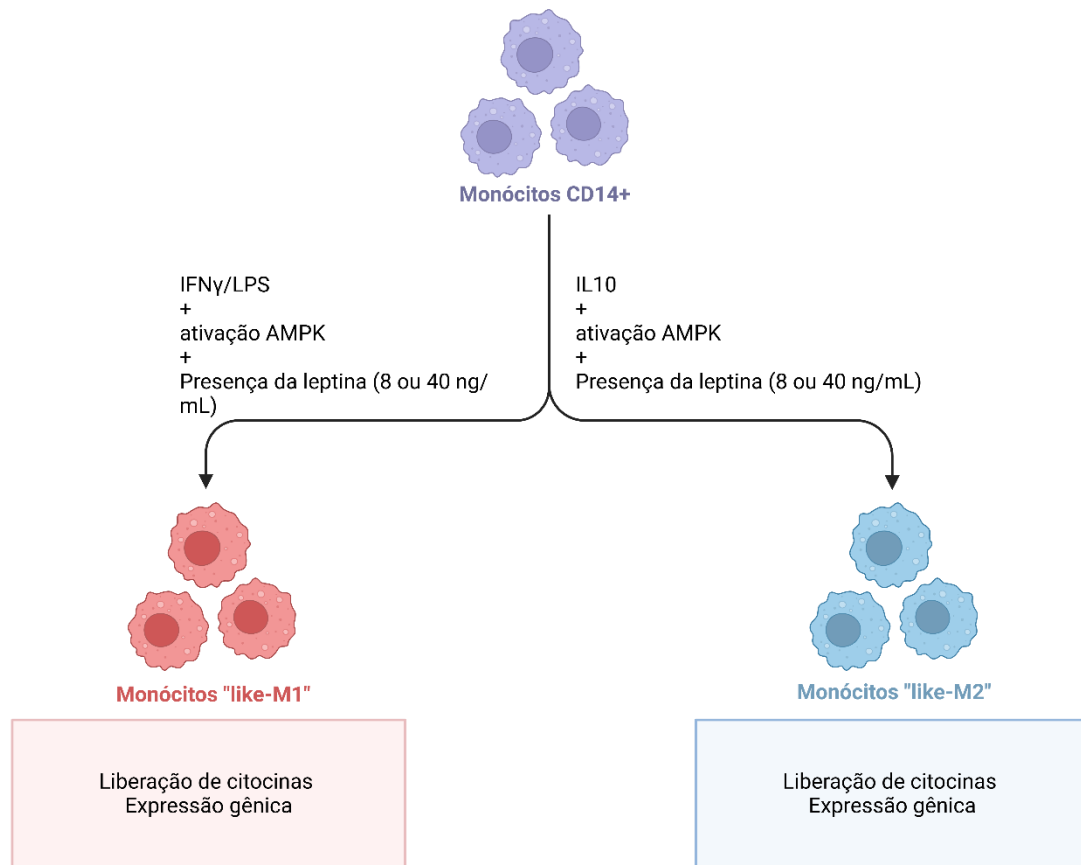
### **Cultura das PBMCs**

Parte das PBMCs, inicialmente separadas na seção anterior, foi destinada à cultura das PBMCs. Um total de  $1 \times 10^6$  PBMC/mL foram incubadas, por 24 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em meio de cultura celular (RPMI-1640) enriquecido com glutamina [2 mM], HEPES [20 mM], 10% de soro bovino fetal e antibióticos penicilina [100 U/mL] e estreptomicina [0,1 mg/mL] em placas de cultura de 24 poços (Kasvi, PR, Brasil). As PBMCs foram cultivadas na ausência ou presença de LPS [10 ng/mL] (*Escherichia coli*, tipo: 0111: B4; Sigma, St. Louis, MO) para testar a resposta inflamatória inata (especialmente, monócitos), ou com *Phorbol* 12-miristato 13-acetato (PMA) [50 ng/mL] (Sigma, St. Louis, MO) mais ionomicina [1 µg/mL] (Sigma, St. Louis, MO) para verificar a produção de citocinas, especialmente por linfócitos (Olean-Oliveira et al., 2023). Após 24 h, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior análise das concentrações de IL-6, IL-10 e TNF-α (condição

controle e LPS) e IL-10 e INF- $\gamma$  (condição controle e PMA+ionomicina) com kits ELISA da empresa R&D (Minneapolis, EUA).

### **Isolamento e polarização dos monócitos “like-M1” e “like-M2”**

Em torno de 16 mL do sangue periférico de cada voluntário, coletado em tubos contendo K3-EDTA, foi utilizado para isolar os monócitos clássicos CD14<sup>+</sup> por seleção negativa utilizando o kit *EasySep™ Direct Human Monocyte Isolation (Stem Cell)*. O Kit isola monócitos clássicos diretamente do sangue por seleção imunomagnética negativa. Após o isolamento, os monócitos foram avaliados quanto a viabilidade celular (maior que 95%) e número de células pela coloração com Azul de Tripan na Câmara de Neubauer. Posteriormente, 200.000 monócitos ( $2 \times 10^5$ ) clássicos foram plaqueados em placas de cultura de poliestireno de 24 poços (Kasvi, PR, Brasil), por 24 horas, em meio de cultura (RPMI-1640 – Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi enriquecido com glutamina (2mM), 10% de soro bovino fetal e antibióticos, tais como penicilina [100 U/mL] e estreptomicina [0,1 mg/mL], em volume final de 1 mL. O período de incubação foi acompanhado pela polarização dos monócitos para os fenótipos “like M1” ou “like M2”, através da adição de 20 ng/mL de IFN- $\gamma$  (Peprotech) e 50 ng/mL de LPS (Sigma) ou 20 ng/mL de IL-10 (Peprotech), respectivamente (Islam et al., 2024). Além disso, o tratamento com recombinante da leptina (8 ou 40 ng/mL) e ativador da AMPK (ribonucleotídeo 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) – 500  $\mu$ M) foi realizado para avaliar o efeito desse hormônio e sensor energético no processo de polarização dos monócitos (**Figura 6**). Após incubação, o meio de cultura foi coletado e armazenado a -80°C para posterior análise das concentrações de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10) pelo ELISA com kits DuoSet da empresa R&D (Minneapolis, EUA). Os monócitos polarizados foram removidos da placa para extração do ácido ribonucleico (RNA) total com 500 $\mu$ L/poço de reagente Brazol (LGC Biotechnology Ltda., Cotia, SP), seguindo as recomendações do fabricante, para análise da expressão gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR).



**Figura 6.** Polarização dos monócitos. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

### **Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real**

Após extração do RNA total, seguindo as recomendações do fabricante, a quantificação e a pureza do RNA foram determinadas analisando a absorvância das leituras no espectrofotômetro no comprimento de ondas a 260nm e 260nm/280nm, respectivamente. Posteriormente, o RNA total foi utilizado para a geração do DNA complementar (cDNA) usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher SCIENTIFIC, cat: 4368813), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA isolado foi armazenado a -80°C para posterior análise por RT-PCR.

Foram analisados genes responsáveis por expressar: 1) marcadores do fenótipo de macrófagos pró-inflamatórios “like-M1” e anti-inflamatórios “like-M2” (CD206, TNF- $\alpha$  e IL-10-receptor alfa (IL-10RA)), 2) fatores de transcrição e sensores energéticos (AMPK, PPAR- $\gamma$ , STAT3, NF $\kappa$ Bp65) e 3)

enzimas metabólicas (hexoquinase e citrato sintase) (**Tabela 1**). A reação de RT-PCR, contendo cDNA e primers, foi realizada em condições de ciclagem pré-determinadas com SYBR Green Fast. A expressão gênica foi quantificada pelo método comparativo utilizando a expressão da hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase-1 (HPRT1) como gene de referência.

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para análise de expressão gênica

<b>Gene</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>
CD206	GTGCGGAACCACTACTGACT	GCTGGTCAGCGGGTTTTAT
TNF- $\alpha$	GCTGCACTTTGGAGTGATCG	TCACTCGGGGTTTCGAGAAGA
IL-10RA	AACTGGACCGTCACCAACAC	TCCCGAGGATGAAGCCATTG
AMPK $\alpha$ 1	GGCACGCCATAACCCTTGAT	TCTTCCTTCGTACACGCAAATAA
PPAR- $\gamma$	AAGAGCCTTCCAACCTCCC	GAAACCCTTGCATCCTTCAC
STAT3	CTTTGAGACCGAGGTGTATCACC	GGTCAGCATGTTGTACCACAGG
NF $\kappa$ Bp65	GAAGCACGAATGACAGAGGC	GCTTGGCGGATTAGCTCTTTT
Hexoquinase 1	GCAGCTCCTGGCCTATTACT	AGAGTTTCATCGGAGAGCCG
Citrato sintase	GGGTATCAGCCGAACCAAGT	CCAATACCGCTGCCTTCTCT
HPRT1	CTTTGCTTTCCTTGGTCAGGC	ACACTTCGTGGGGTCCTTTT

### **Procedimentos de Análise Estatística dos Dados**

Foi realizada uma análise de variância de uma via (ANOVA-*One Way*) com o objetivo de avaliar se havia diferenças na idade, altura, índice de massa corporal (IMC),  $VO_{2\text{pico}}$  ( $\text{mL.kg.min}^{-1}$ ),  $VO_{2\text{pico}}$  ( $\text{mL.kgMM.min}^{-1}$ ), comportamento sedentário, massa de gordura, massa magra, massa livre de gordura, massa corporal total, % de gordura na região andróide e ginóide, gordura visceral (g), gordura visceral ( $\text{cm}^2$ ) e ingestão de nutrientes entre os subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia Idade-Alta ACR. A normalidade dos resíduos foi confirmada anteriormente por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. O pressuposto de homogeneidade de variância foi avaliado por meio do teste de Levene e o post-hoc *Hockberg* solicitado para as variáveis que apresentaram homogeneidade de variância. Considerando a heterogeneidade de variância nas variáveis  $VO_{2\text{pico}}$ , gordura visceral (g e  $\text{cm}^2$ ) e alguns nutrientes ingeridos, foi solicitada a correção de *Welch* e avaliação de post-hoc por meio da correção de *Games-Howell* (Field, 2020). O Delta de Glass foi aplicado para mensurar o tamanho de efeito nas múltiplas comparações e interpretado como tamanho de efeito irrisório ( $< 0,20$ ), pequeno ( $> 0,21$  e  $< 0,39$ ), médio ( $> 0,40$  e  $< 0,79$ ) e alto ( $> 0,80$ ) (Lakens, 2013). Adicionalmente, uma vez que os dados

do tempo destinado em atividades físicas nas intensidades leve, moderada, vigorosa e moderada/vigorosa, bem como a ingestão de colesterol, cobre, vitamina A, vitamina B9 e niacina não apresentaram normalidade dos resíduos, o teste de Kruskal-Wallis e post hoc com correção de Bonferroni foram solicitados para avaliar as diferenças entre grupos nessas variáveis. Para essa análise, o tamanho do efeito entre as múltiplas comparações foi calculado por meio da correlação de postos ( $r$ ) com a equação  $r = z/\sqrt{N}$  e interpretado como irrisório ( $< 0,2$ ), pequeno ( $> 0,2$  e  $< 0,3$ ), médio ( $> 0,3$  e  $< 0,5$ ) e alto ( $> 0,5$ ) (Field, 2020). Os dados são apresentados como diferenças entre médias e erro padrão, média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil.

Nas análises principais onde indivíduos com alta ACR (jovens e com meia idade) foram analisados em conjunto e comparados com os indivíduos com baixa ACR, a idade ou massa de gordura total (comparações na concentração da leptina) foram inseridas como covariáveis. Adicionalmente, a gordura visceral foi inserida como covariável nas subanálises da polarização dos monócitos e condições relacionadas com o perfil inflamatório e metabólico entre os subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia Idade-Alta ACR. Em detalhes, para investigar diferenças entre os grupos (Indivíduos com alta ACR vs baixa ACR ou Jovens-Baixa ACR vs Jovens-Alta ACR vs Meia Idade-Alta ACR) sobre variáveis inflamatórias/metabólicas, com ou sem inserção da covariável (gordura visceral, idade ou massa de gordura total) no modelo, foi utilizado o modelo linear generalizado (GLM) (McCullagh & Nelder, 1989). O mesmo modelo foi utilizado para avaliar os efeitos de grupo (Indivíduos com alta ACR vs baixa ACR ou Jovens-Baixa ACR vs Jovens-Alta ACR vs Meia Idade-Alta ACR), tratamento (condição controle x condição estimulada) e de interação (grupo\*tratamento) sobre os desfechos relacionados ao perfil inflamatório. O GLM foi ajustado com a função de ligação de identidade para todas as variáveis e distribuição de probabilidade que apresentou melhor ajuste aos dados com base no Critério de Informações de Akaike (AIC) (McCullagh, 1989). O post hoc de Bonferroni foi solicitado para análises a posteriori. Os dados derivados do GLM são apresentados como média e desvio padrão.

Por fim, a correlação de Spearman foi aplicada entre as concentrações da leptina e a liberação de citocinas pelos monócitos “like-M1” e “like-M2”. O coeficiente de correlação ( $r$ ) foi categorizado como magnitude nula (0,00), fraca (0,10-0,39), moderada (0,40-0,69), forte (0,70-0,89), muito forte (0,90-0,99) e perfeita (1,00) (Schober et al., 2018). A variância compartilhada foi calculada elevando o valor do  $r$  ao quadrado e multiplicando por 100 (percentual). Todas as análises foram executadas no IBM® SPSS Statistics 28 e os gráficos apresentados na sessão de resultados formulados no GraphPad Prism 10. O nível de significância assumido foi de 0,05 e apresentado como  $p$ -GV quando ajustado para a gordura visceral,  $p$ -idade quando ajustado pela idade e  $p$ -GT quando ajustado pela massa de gordura total.

## RESULTADOS

### Caracterização da amostra

Inicialmente, os subgrupos foram caracterizados em relação às variáveis que sabidamente modulam o perfil inflamatório e poderiam atuar como fatores de confusão na análise do impacto da ACR na polarização dos monócitos, como a composição corporal, nível de atividade física, comportamento sedentário, ingestão alimentar e soro *status* para vírus latentes, como o CMV e HSV-1 e 2. As análises foram primeiramente realizadas entre os subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia Idade-Alta ACR, a fim de se apropriar das diferenças entre os grupos com alta ACR e as possíveis limitações da análise da polarização dos monócitos desses indivíduos em conjunto. Houve diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos no IMC [ $F(2; 24) = 5,345, p = 0,012$ ], massa corporal total [ $F(2; 24) = 4,848, p = 0,017$ ], massa de gordura [ $F(2; 24) = 15,127, p < 0,001$ ], porcentagem de gordura androide [ $F(2; 24) = 19,353, p < 0,001$ ], porcentagem de gordura ginoide [ $F(2; 24) = 26,456, p < 0,001$ ], gordura visceral (g) [Welch's  $F(2, 11,139) = 12,549, p < 0,001$ ], gordura visceral (cm<sup>2</sup>) [Welch's  $F(2, 11,175) = 12,539, p < 0,001$ ], comportamento sedentário (h/dia) [ $F(2; 24) = 5,817, p = 0,009$ ] e nível de atividade física vigoroso [ $H(2) = 6,511, p = 0,039$ ]. Como

esperado, os subgrupos também diferiram na idade [ $F(2; 24) = 44,008, p < 0,001$ ],  $VO_{2pico}$  (mL.kg.min<sup>-1</sup>) [ $F(2; 24) = 46,895, p < 0,001$ ] e  $VO_{2pico}$  (mL.kgMM.min<sup>-1</sup>) [ $F(2; 24) = 10,874, p < 0,001$ ]. Por outro lado, não houve diferenças estatísticas no tempo destinado em atividades físicas de intensidade leve (min/dia) [ $H(2) = 2,798, p = 0,247$ ], moderada (min/dia) [ $H(2) = 0,998, p = 0,607$ ] e moderada/vigorosa (min/dia) [ $H(2) = 2,054, p = 0,358$ ], massa magra [ $F(2; 24) = 0,038, p = 0,963$ ], massa livre de gordura [ $F(2; 24) = 0,023, p = 0,977$ ] e altura [ $F(2; 24) = 0,304, p = 0,741$ ], bem como os subgrupos apresentaram semelhante percentual de indivíduos soropositivos para o CMV e HSV 1 e 2 (**Tabela 2**). As diferenças específicas, corrigidas para múltiplas comparações, são detalhadas na **Tabela Suplementar 1 (Anexo 1)** e os valores médios com desvio padrão na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Caracterização da amostra

	<b>Jovens-Baixa ACR</b>	<b>Jovens-Alta ACR</b>	<b>Meia idade-Alta ACR</b>
	<b>(Média±DP)</b>	<b>(Média±DP)</b>	<b>(Média±DP)</b>
<b>Idade (anos)</b>	27,33±6,90	23,75±5,23	50,29±4,85*
<b>Altura (metros)</b>	1,76±0,06	1,76±0,06	1,74±0,05
<b>IMC</b>	29,04±5,58&	22,49±3,41	25,27±2,93
<b>Massa de gordura (Kg)</b>	30,11±10,73#	10,27±4,20	16,85±6,12
<b>Massa magra (Kg)</b>	57,70±8,36	56,64±9,66	57,22±7,19
<b>Massa livre gordura (Kg)</b>	60,58±8,68	59,73±10,02	60,30±7,41
<b>Massa corporal total (Kg)</b>	90,70±18,16&	70,00±12,48	77,15±10,98
<b>% gordura região andróide</b>	38,67±9,58#	12,68±5,65	26,18±11,47*
<b>% gordura região ginóide</b>	33,51±6,64#	13,40±5,38	20,52±6,45
<b>Gordura visceral (g)</b>	954,45±512,72&	187,88±132,14	686,43±557,37
<b>Gordura visceral (cm<sup>2</sup>)</b>	1011,72±543,49&	199,25±140,03	711,85±571,15
<b>VO<sub>2pico</sub> (mL.kg.min<sup>-1</sup>)</b>	41,42±4,13#	61,34±4,71	58,58±6,53
<b>VO<sub>2pico</sub> (mL.kgMM.min<sup>-1</sup>)</b>	64,26±4,88#	73,81±9,22	78,65±6,64
<b>Comportamento Sed (h/dia)</b>	9,52±4,29#	5,71±2,14	4,81±1,73
<b>Soropositividade CMV</b>	9/12 (75%)	7/8 (87,5%)	5/7 (71,4%)
<b>Soropositividade HSV</b>	7/12 (58,3%)	5/8 (62,5%)	5/7 (71,4%)
	<b>Mediana (IQ)</b>	<b>Mediana (IQ)</b>	<b>Mediana (IQ)</b>

<b>AF leve (min/dia)</b>	12,86(4,64-17,14)	17,14(17,14-34,29)	17,14(8,57-34,29)
<b>AF moderada (min/dia)</b>	22,86(0,00-64,28)	27,86(17,14-35,50)	42,86(5,71-57,14)
<b>AF vigorosa (min/dia)</b>	2,14(0,00-17,14)	47,14(5,00-66,42)	35,00(18,57-51,43)
<b>AFMV (min/dia)</b>	30,00(0,35-81,42)	79,28(35,00-90,00)	80,00(22,14-85,71)

**Nota.** IMC = Índice de Massa Corporal; Kg = Quilogramas; % = percentual; g = gramas; cm<sup>2</sup> = centímetros quadrados; VO<sub>2pico</sub> (mL.kg.min<sup>-1</sup>) = consumo de oxigênio pico em mililitros por quilograma de peso no espaço de tempo de um minuto; VO<sub>2pico</sub> (mL.kgMM.min<sup>-1</sup>) = consumo de oxigênio pico em mililitros por quilograma de massa magra no espaço de tempo de um minuto; Sed = sedentário; AF = atividade física; AFMV = atividade física de intensidade moderada a vigorosa; min = minutos; DP = desvio padrão; IQ = intervalo interquartil; ACR = aptidão cardiorrespiratória. \* = diferença estatística comparado com os grupos Jovens-Baixa ACR e Jovens-Alta ACR. & = diferença estatística comparado com o grupo Jovens-Alta ACR. # = diferença estatística comparado com os grupos Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR.

O teste de Kruskal-Wallis confirmou diferença estatisticamente significativa no nível de atividade física vigoroso entre os subgrupos, com múltiplas comparações com ajuste de Bonferroni apontando diferença marginal com superioridade no subgrupo Jovens-Alta ACR comparado com o subgrupo Jovens-Baixa ACR, embora a magnitude da diferença foi considerada alta (***p* = 0,077, *r* = 0,50**) (Tabela 2 e Tabela Suplementar 1 (Anexo 1)). O comportamento sedentário foi maior no subgrupo Jovens-Baixa ACR quando comparado com Jovens-Alta ACR (***p* = 0,048**) e Meia idade-Alta ACR (***p* = 0,016**), entretanto, os subgrupos com alta ACR (indivíduos jovens x meia idade) não diferiram (***p* = 0,932**) (Tabela 2 e Tabela Suplementar 1 (Anexo 1)). Vale ressaltar que o subgrupo Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR também apresentaram semelhança no VO<sub>2pico</sub> (mL.kg.min<sup>-1</sup>) (***p* = 0,641**) e VO<sub>2pico</sub> (mL.kgMM.min<sup>-1</sup>) (***p* < 0,447**) (Tabela 2 e Tabela Suplementar 1 (Anexo 1)), garantindo eficiência nas análises do impacto da ACR no perfil inflamatório de acordo com a idade. A Tabela 3 apresenta os dados da ingestão alimentar, no qual os subgrupos não diferiram na ingestão de grande parte dos macros e micros nutrientes quantificados, com exceção para menor ingestão de fibras e vitamina C pelo subgrupo Jovens-Baixa ACR quando comparado com o subgrupo Meia idade-Alta ACR (***p* = 0,022 e *p* = 0,024, respectivamente**). Por outro lado, os subgrupos diferiram marcadamente nos estoques e distribuição da gordura corporal, especialmente na porcentagem de gordura andróide e ginóide, massa de gordura total e visceral (ver detalhes na Tabela 2 e Tabela

**Suplementar 1 (Anexo 1).** Desta forma, uma vez que a distribuição de gordura corporal na região visceral é fortemente ligada a desfechos inflamatórios, as subanálises da presente pesquisa (Jovens baixa-ACR vs Jovens alta-ACR vs Meia idade-alta ACR) analisando o impacto da ACR na polarização dos monócitos e perfil inflamatório/metabólico geral são acompanhadas pelo controle da gordura visceral como covariável.

**Tabela 3.** Comportamento alimentar

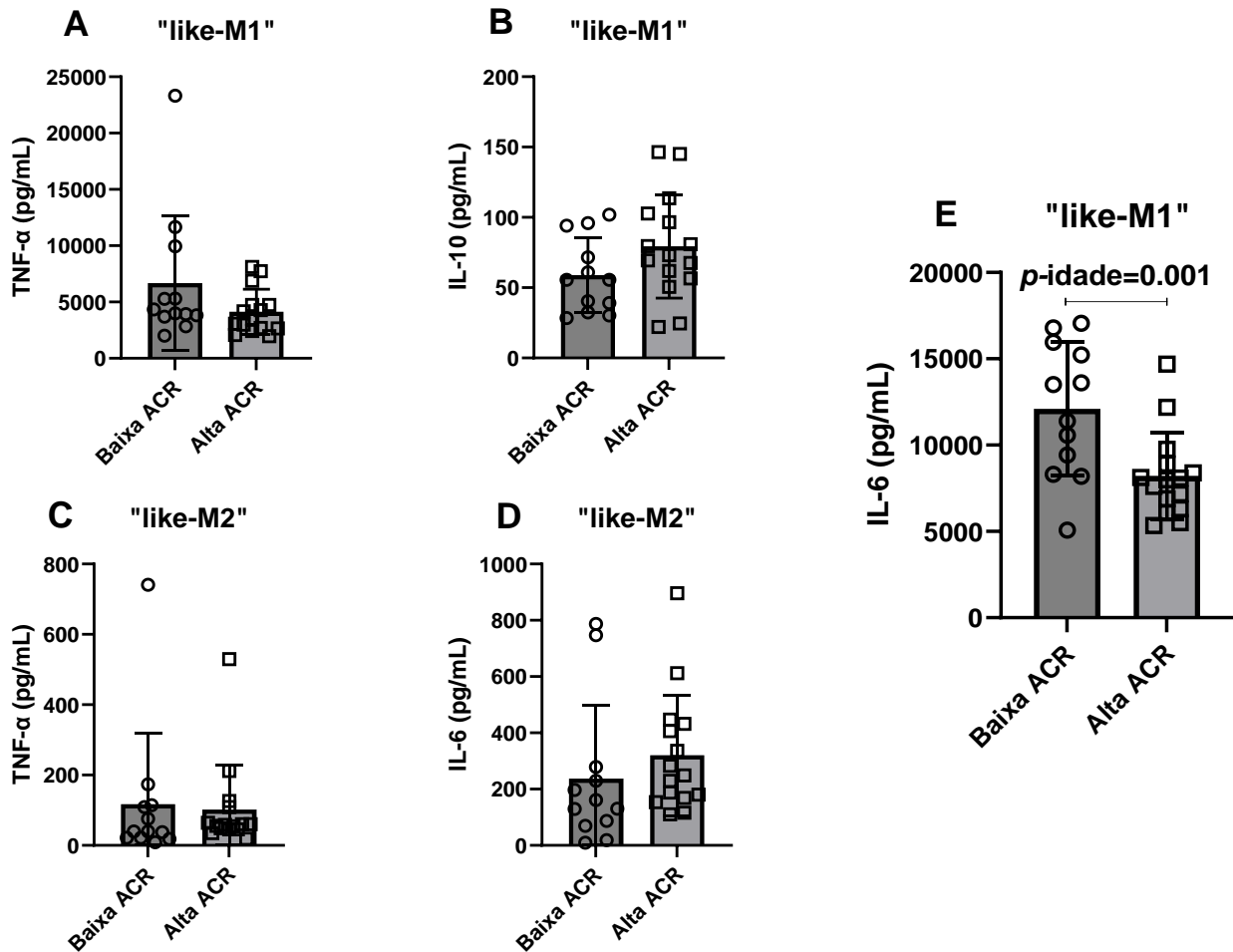
	<b>Jovens-Baixa ACR</b> (Média±DP)	<b>Jovens-Alta ACR</b> (Média±DP)	<b>Meia idade-Alta ACR</b> (Média±DP)
<b>Proteínas (g)</b>	107,12±46,26	131,36±52,68	92,73±52,20
<b>Lipídeos (g)</b>	70,94±24,91	97,83±26,13	71,31±45,59
<b>Carboidratos (g)</b>	239,96±70,46	374,38±159,42	275,72±125,71
<b>Quilocalorias</b>	2028±507	2862±872	2080±1065
<b>AG Monoinsaturados (g)</b>	21,14±7,72	29,37±9,55	21,62±13,17
<b>AG Poliinsaturados (g)</b>	10,80±3,11	13,43±8,82	13,11±9,92
<b>AG Saturados (g)</b>	25,80±10,61	33,20±11,53	29,94±18,91
<b>AG Trans (g)</b>	1,20±0,70	1,22±1,39	0,79±0,58
<b>Fibras (g)</b>	14,67±5,08a	35,97±30,00	29,07±10,05
<b>Cálcio (mg)</b>	578,41±309,42	912,62±600,62	561,33±325,60
<b>Magnésio (mg)</b>	191,28±40,56	362,17±298,28	277,26±129,84
<b>Fósforo (mg)</b>	1166,17±379,14	1432,05±794,38	1083,82±690,69
<b>Ferro (mg)</b>	12,17±3,09	16,67±11,96	12,75±8,07
<b>Sódio (mg)</b>	2144,62±624,83	1956,68±277,03	1696,95±885,56
<b>Potássio (mg)</b>	1919,71±467,45	3366,98±2239,72	2689,51±1621,22
<b>Zinco (mg)</b>	14,26±7,79	15,53±8,00	12,31±9,43
<b>Selênio (mcg)</b>	45,63±17,64	83,38±60,43	39,37±10,38
<b>Vitamina B12 (mg)</b>	5,18±2,93	5,35±2,51	14,25±26,59
<b>Tiamina (mg)</b>	0,85±0,18	1,21±0,74	0,96±0,40
<b>Riboflavina (mg)</b>	1,33±0,54	1,47±0,86	1,24±0,97
<b>Piridoxina (mg)</b>	0,81±0,34	0,80±0,35	0,86±0,59

Vitamina C (mg)	41,04±50,88a	164,36±150,11	154,38±80,43
Vitamina D (mcg)	2,13±2,05	3,14±3,80	4,02±3,35
Vitamina E (mg)	5,02±1,57	7,33±3,98	9,87±6,72
	<b>Mediana (IQ)</b>	<b>Mediana (IQ)</b>	<b>Mediana (IQ)</b>
Colesterol (mg)	331,93(195,40-475,33)	298,33(195,03-540,16)	269,96(173,73-624,49)
Cobre (mg)	0,76(0,66-0,86)	0,60(0,56-3,83)	1,51(0,93-5,24)
Vitamina A-RE (mcg)	381,73(301,61-439,56)	458,46(166,56-986,33)	870,76(306,09-3838,33)
Vitamina A-REA (mcg)	284,73(192,33-349,10)	423,33(111,26-540,86)	480,26(186,78-3292,95)
Vitamina B9 (mcg)	223,26(197,65-306,43)	206,63(174,00-1037,03)	336,08(202,07-568,63)
Niacina (mg)	22,60(14,61-25,55)	15,03(9,56-20,43)	11,38(8,14-23,02)

**Nota.** AG = ácidos graxos; RE = *retinol equivalente*; REA = *retinol activity equivalent*; g = gramas; mg = miligramas; mcg = microgramas; DP = desvio padrão; IQ = intervalo interquartil; ACR = aptidão cardiorrespiratória. a = diferença estatística comparado com o grupo Meia idade-Alta ACR.

### Objetivo 1: Impacto da aptidão cardiorrespiratória na polarização dos monócitos

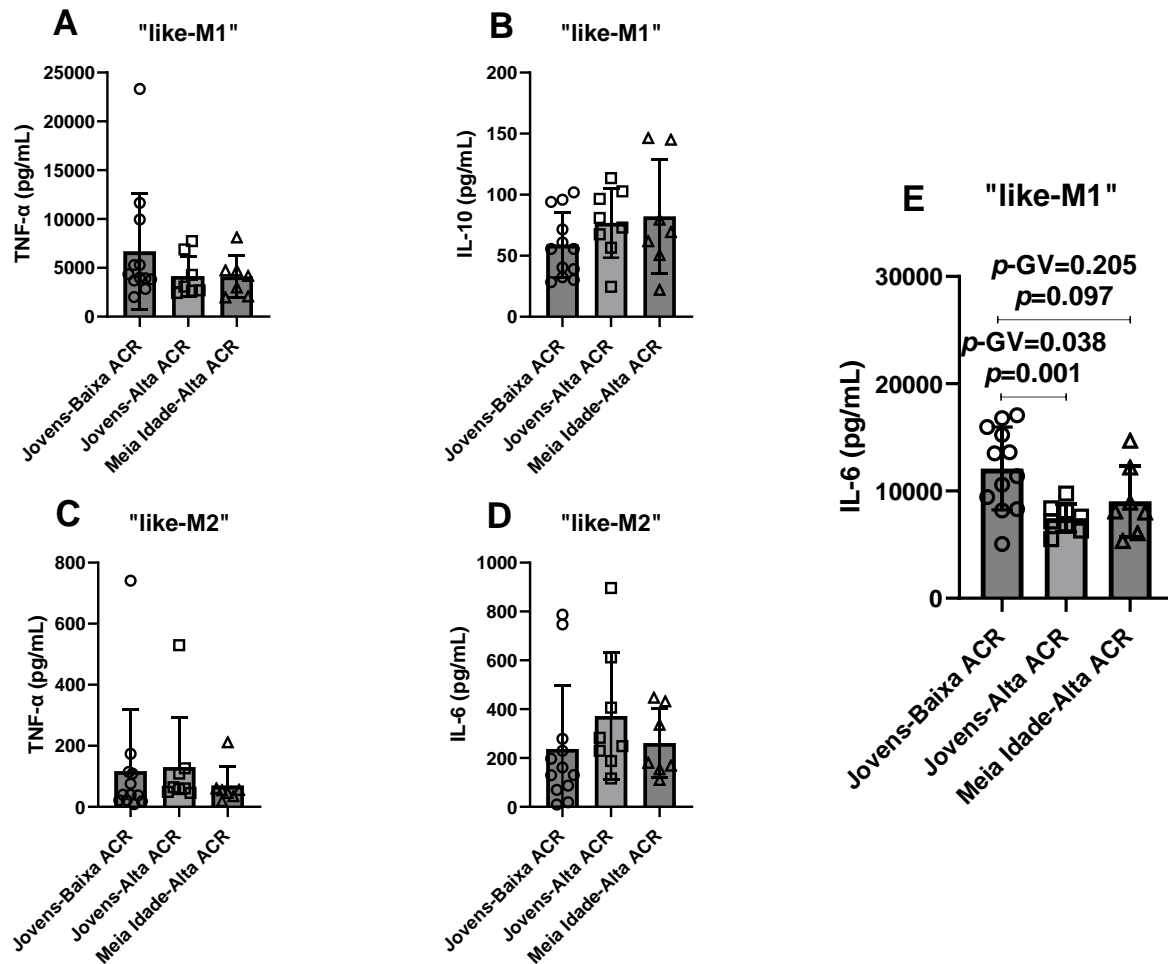
Monócitos e macrófagos são potentes liberadores da IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10 e essas citocinas são frequentemente utilizadas como marcadores fenotípicos, com maior secreção por essas células de IL-6 e TNF- $\alpha$  em repouso/estado basal geralmente interpretada como função/fenótipo mais pró-inflamatório e maior liberação de IL-10 interpretada como mais anti-inflamatória. Após polarização para o fenótipo “like M1”, indivíduos com baixa ACR apresentaram maior liberação da IL-6 comparado com indivíduos com alta ACR [**Wald (1) = 10,902; p-idade < 0,001**] (**Figura 7E**). Por outro lado, não houve diferenças de grupo na liberação do TNF- $\alpha$  [**Wald (1) = 1,980; p-idade = 0,159**] e IL-10 [**Wald (1) = 2,651; p-idade = 0,104**] (**Figura 7A e 7B, respectivamente**) por monócitos “like-M1”, bem como os grupos não diferiram na liberação do TNF- $\alpha$  [**Wald (1) = 0,021; p-idade = 0,884**] e IL-6 [**Wald (1) = 1,093; p-idade = 0,296**] pelos monócitos “like-M2” (**Figura 7C e 7D, respectivamente**).



**Figura 7.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com o status da ACR.  $p$ -idade = Análises ajustadas pela idade.

O impacto da ACR, de acordo com a idade, sobre a liberação de citocinas nos monócitos polarizados foi explorado nas subanálises entre os subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia Idade-Alta ACR (**Figura 8**). Após polarização para o fenótipo “like M1”, as diferenças entre o status da ACR permaneceram para as concentrações da IL-6 [**Wald (2) = 13,119;  $p = 0,001$** ], com monócitos “like-M1” do subgrupo Jovens-Baixa ACR apresentando maior liberação que o subgrupo Jovens-Alta ACR ( $p = 0,001$ ) e diferença marginal para maior liberação que o subgrupo Meia idade-Alta ACR ( $p = 0,097$ ) (**Figura 8E**). A síntese da IL-6 não diferiu em monócitos “like-M1” entre os grupos Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR ( $p = 0,636$ ) (**Figura 8E**). A inserção da gordura

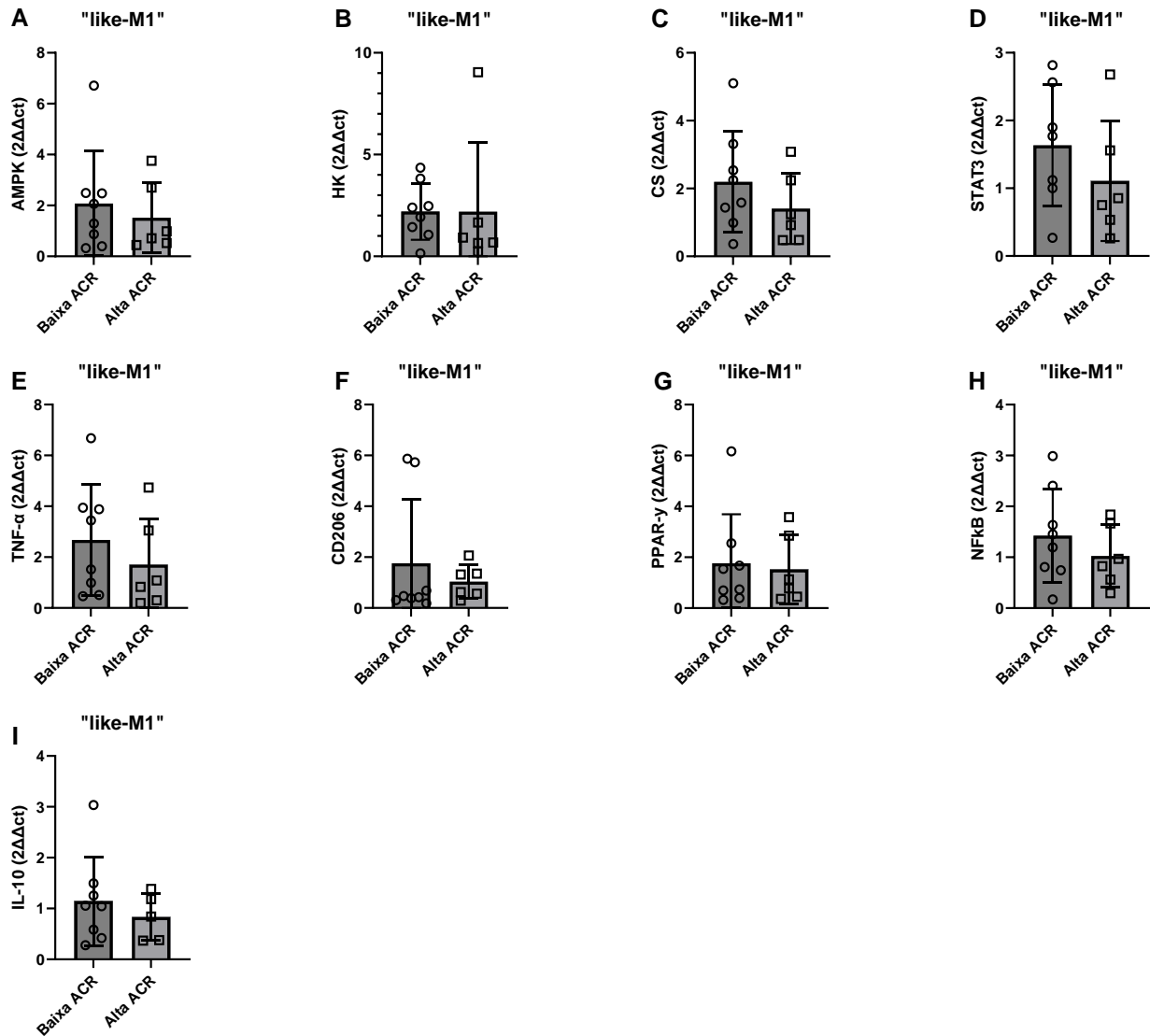
visceral como covariável não interferiu significativamente nas comparações ( $p\text{-GV} = 0,781$ ), mantendo o efeito principal de grupo independente desta variável [**Wald (2) = 6,250;  $p\text{-GV} = 0,044$** ], embora com perda da diferença marginal entre os subgrupos Jovens-Baixa ACR e Meia idade-Alta ACR nas múltiplas comparações (**Figura 8E**). Não houve diferenças entre os subgrupos na liberação do TNF- $\alpha$  por monócitos “like-M1” [**Wald (2) = 4,251;  $p = 0,119$** ] e a gordura visceral não interferiu significativamente no modelo ( $p\text{-GV} = 0,544$ ), embora houve diferença marginal para o efeito principal de grupo após ajuste [**Wald (2) = 5,047;  $p\text{-GV} = 0,080$** ] (**Figura 8A**). A liberação da IL-10 por monócitos “like-M1” também foi semelhante entre os subgrupos [**Wald (2) = 2,937;  $p = 0,230$** ], mesmo após controle pela gordura visceral [**Wald (2) = 1,803;  $p\text{-GV} = 0,406$** ], no qual não apresentou efeito significativo no modelo ( $p\text{-GV} = 0,483$ ) (**Figura 8B**). Por outro lado, não houve efeitos principais de grupo na liberação, por células “like M2”, do TNF- $\alpha$  [**Wald (2) = 2,167;  $p = 0,338$ ; Wald (2) = 2,932;  $p\text{-GV} = 0,231$** ] e IL-6 [**Wald (2) = 1,275;  $p = 0,529$ ; Wald (2) = 4,002;  $p\text{-GV} = 0,135$** ] (**Figura 8C e 8D, respectivamente**), bem como o controle pela gordura visceral não foi estatisticamente significante para o modelo [**TNF- $\alpha$ :  $p\text{-GV} = 0,629$ ; IL-6:  $p\text{-GV} = 0,166$** ]. Em resumo, células “like-M1” de indivíduos jovens com baixa ACR apresentaram elevado perfil inflamatório, marcado pela liberação da IL-6, quando comparado com indivíduos com ACR, especialmente os mais jovens.



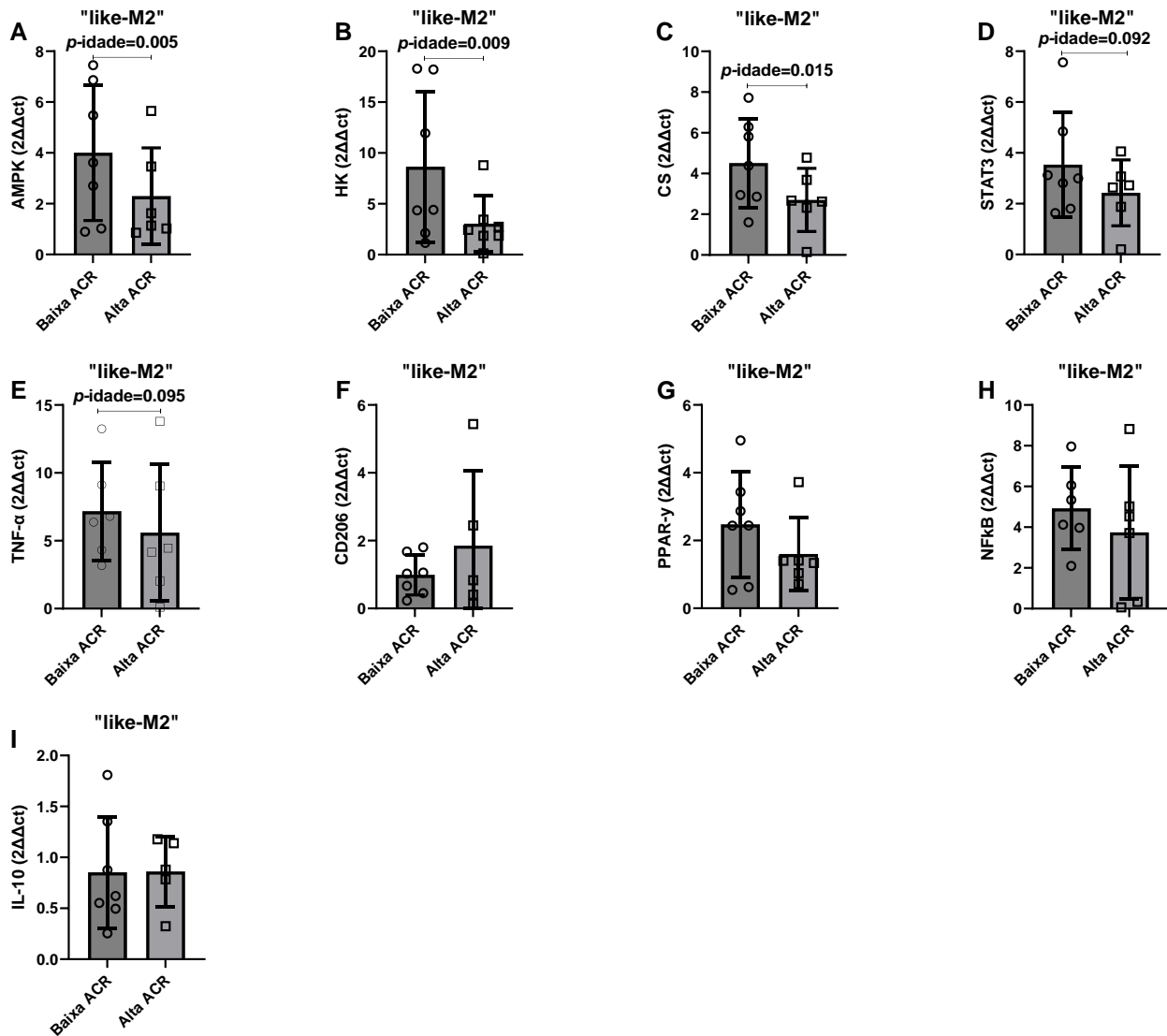
**Figura 8.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com os subgrupos experimentais. *p*-GV = Análises ajustadas pela gordura visceral.

A concentração de marcadores inflamatórios sintetizados por células imunológicas pode não ser capaz de detectar detalhes das diferenças fenotípicas. Dessa forma, a análise fenotípica dos monócitos polarizados de indivíduos com baixa e alta ACR foi ampliada para observações da expressão de diferentes genes metabólicos e inflamatórios. A expressão gênica da AMPK [Wald (1) = 8,035; *p*-idade = 0,005], hexoquinase [Wald (1) = 6,768; *p*-idade = 0,009] e citrato sintase [Wald (1) = 5,974; *p*-idade = 0,015] foi maior em monócitos “like-M2” de indivíduos com baixa ACR quando comparado com indivíduos com alta ACR (Figura 10A, B e C, respectivamente). Superioridades marginais em monócitos “like-M2” de indivíduos com baixa ACR também foram detectadas na expressão da STAT3

[Wald (1) = 2,847; *p*-idade = 0,092] e TNF- $\alpha$  [Wald (1) = 2,793; *p*-idade = 0,095] (Figura 10D e E, respectivamente). Por outro lado, não houve diferenças estatisticamente significantes na expressão do CD206 [“like M1” - Wald (1) = 0,055; *p*-idade = 0,815; “like M2” - Wald (1) = 0,215; *p*-idade = 0,643], PPAR- $\gamma$  [“like M1” - Wald (1) = 0,003; *p*-idade = 0,959; “like M2” - Wald (1) = 2,564; *p*-idade = 0,109], NF- $\kappa$ B [“like M1” - Wald (1) = 0,139; *p*-idade = 0,709; “like M2” - Wald (1) = 2,416; *p*-idade = 0,120], IL-10 [“like M1” - Wald (1) = 0,192; *p*-idade = 0,661; “like M2” - Wald (1) = 0,520; *p*-idade = 0,471], AMPK [“like M1” - Wald (1) = 0,041; *p*-idade = 0,839], hexoquinase [“like M1” - Wald (1) = 0,062; *p*-idade = 0,803], citrato sintase [“like M1” - Wald (1) = 0,727; *p*-idade = 0,394], TNF- $\alpha$  [“like M1” - Wald (1) = 0,252; *p*-idade = 0,616] e STAT-3 [“like M1” - Wald (1) = 0,393; *p*-idade = 0,531] (Figura 9 e 10). Devido às limitações no poder amostral, as subanálises entre os subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia Idade-Alta ACR referente às observações da expressão gênica não foram realizadas. Em conjunto, além de apresentarem maior liberação de IL-6 em monócitos “like-M1”, os indivíduos com baixa ACR exibem expressão genética diferencial em monócitos “like-M2”, especialmente de genes relacionados a proteínas determinantes para engrenar o metabolismo energético e modular a função inflamatória.



**Figura 9.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M1” por 24 horas. A expressão gênica de diferentes genes foi analisada após polarização e apresentada de acordo com o status da ACR.



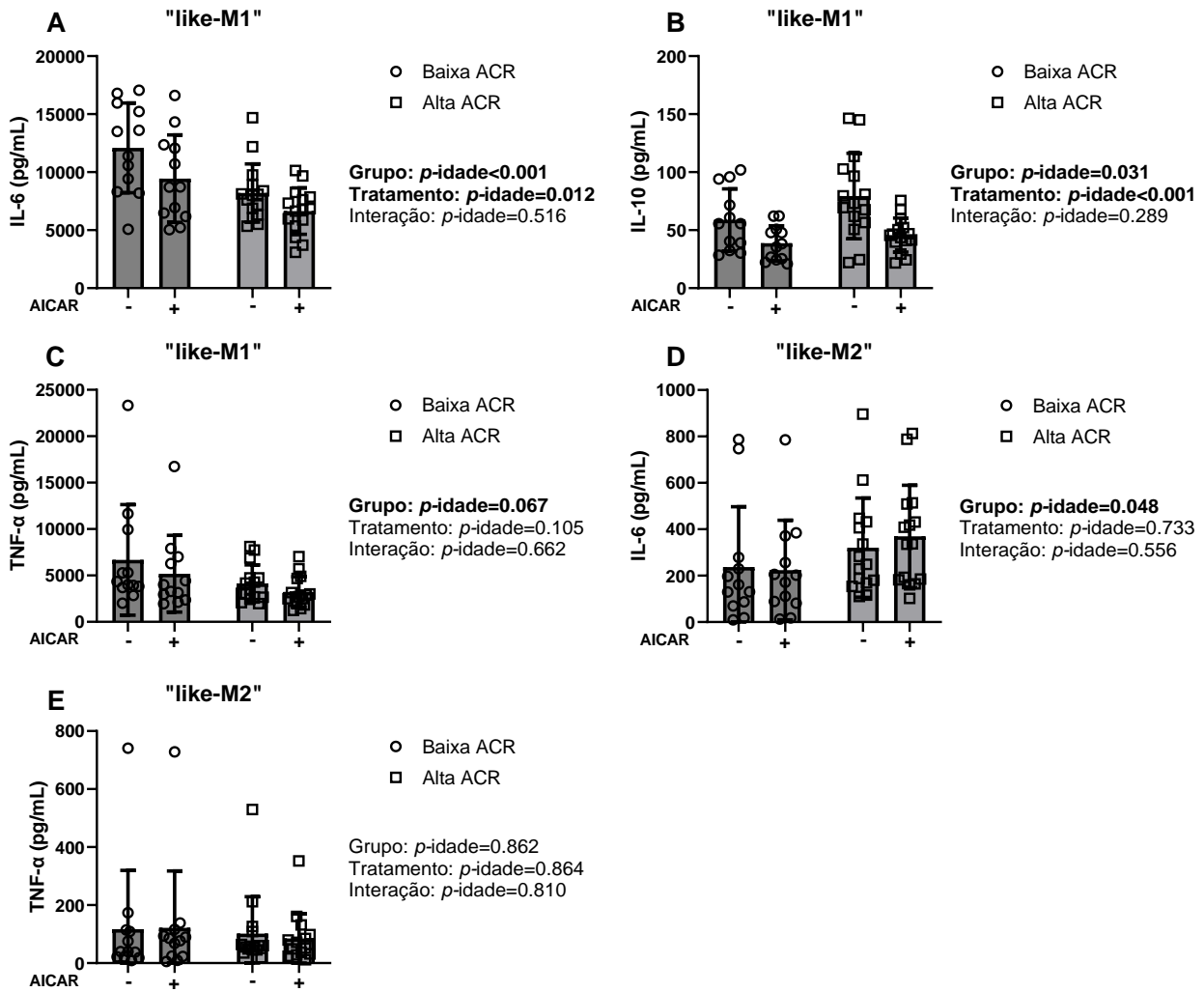
**Figura 10.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M2” por 24 horas. A expressão gênica de diferentes genes foi analisada após polarização e apresentada de acordo com o status da ACR. *p*-idade = Análises ajustadas pela idade.

### Objetivo 1: Ativação da AMPK engrena fenótipo anti-inflamatório independente do status da ACR

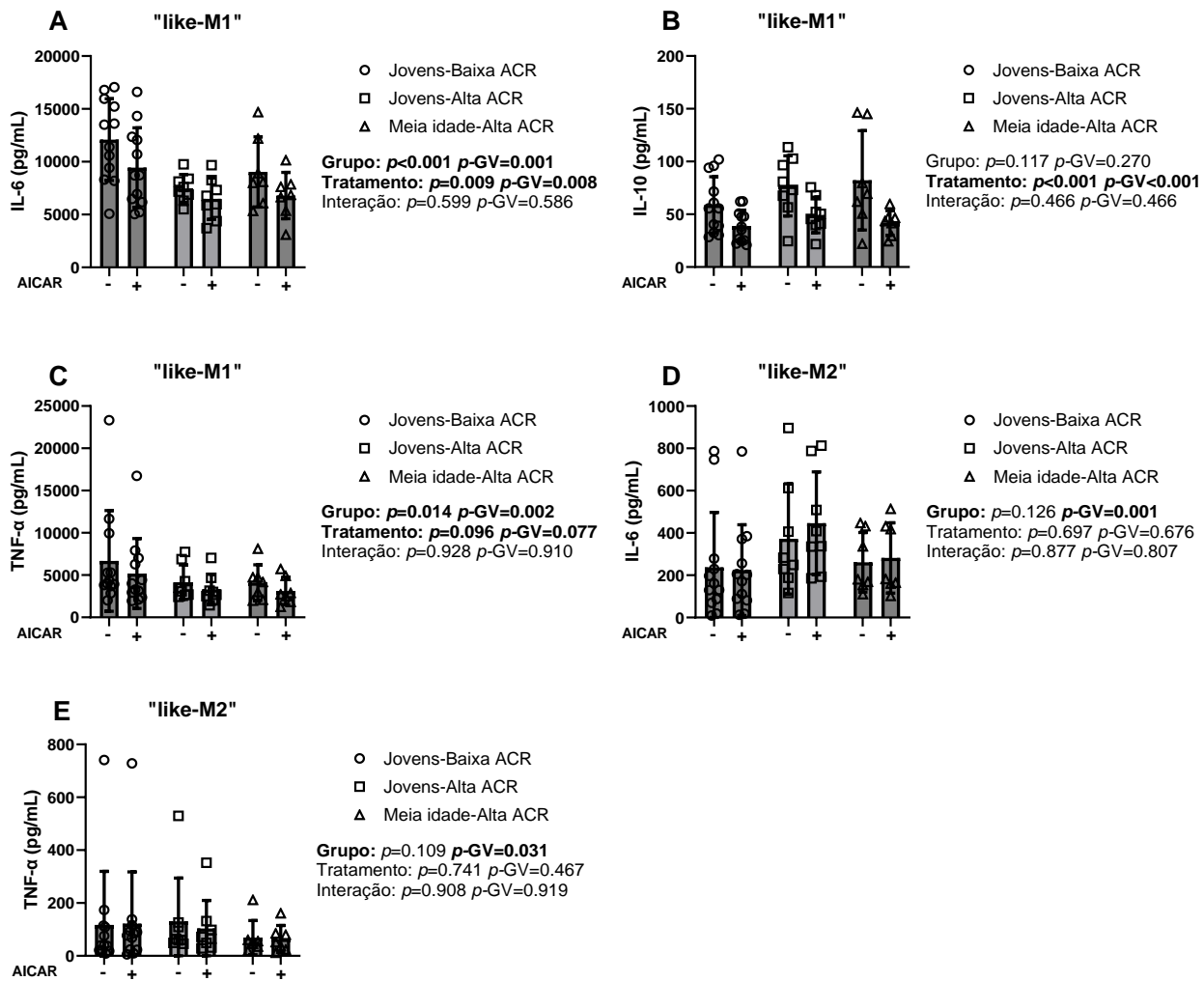
A ativação da AMPK em monócitos/macrófagos geralmente direciona para um fenótipo mais anti-inflamatório. Desta forma, foi analisado o impacto da ativação da AMPK na polarização dos monócitos, de acordo com o status da ACR. Para isso, a análise das concentrações das citocinas e

expressão gênica foram novamente conduzidas após a polarização dos monócitos para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” acompanhada pelo ativador da AMPK (AICAR).

Interessantemente, a ativação da AMPK diminuiu a liberação da IL-6 e IL-10 em monócitos “like-M1” dos indivíduos com baixa e alta ACR [**Efeito principal de tratamento: IL-6 - Wald (1) = 6,318;  $p$ -idade = 0,012 e IL-10: Wald (1) = 17,892;  $p$ -idade < 0,001**], sem interação entre grupo x tratamento (**Figura 11A e 11B, respectivamente**). Por outro lado, a ativação da AMPK durante a polarização dos monócitos para o fenótipo “like-M1” não alterou a liberação do TNF- $\alpha$  (**Figura 11C**) e não alterou a liberação da IL-6 e TNF- $\alpha$  após polarização para o fenótipo “like-M2” (**Figura 11D e 11E, respectivamente**). O mesmo padrão na liberação de citocinas frente a ativação da AMPK foi confirmado na subanálise entre os subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR (**Figura 12**). Com adição da diferença marginal para a redução do TNF- $\alpha$  após estímulo com AICAR em monócitos “like-M1” [**Efeito principal de tratamento: Wald (1) = 2,763;  $p$  = 0,096; Wald (1) = 3,125;  $p$ -GV = 0,077**], embora também sem interação entre os fatores (**Figura 12C**). Esses dados sugerem responsividade diferencial entre os fenótipos ou de acordo com o ambiente de polarização.



**Figura 11.** Monócitos CD14+ foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com o status da ACR.  $p$ -idade = Análises ajustadas pela idade.

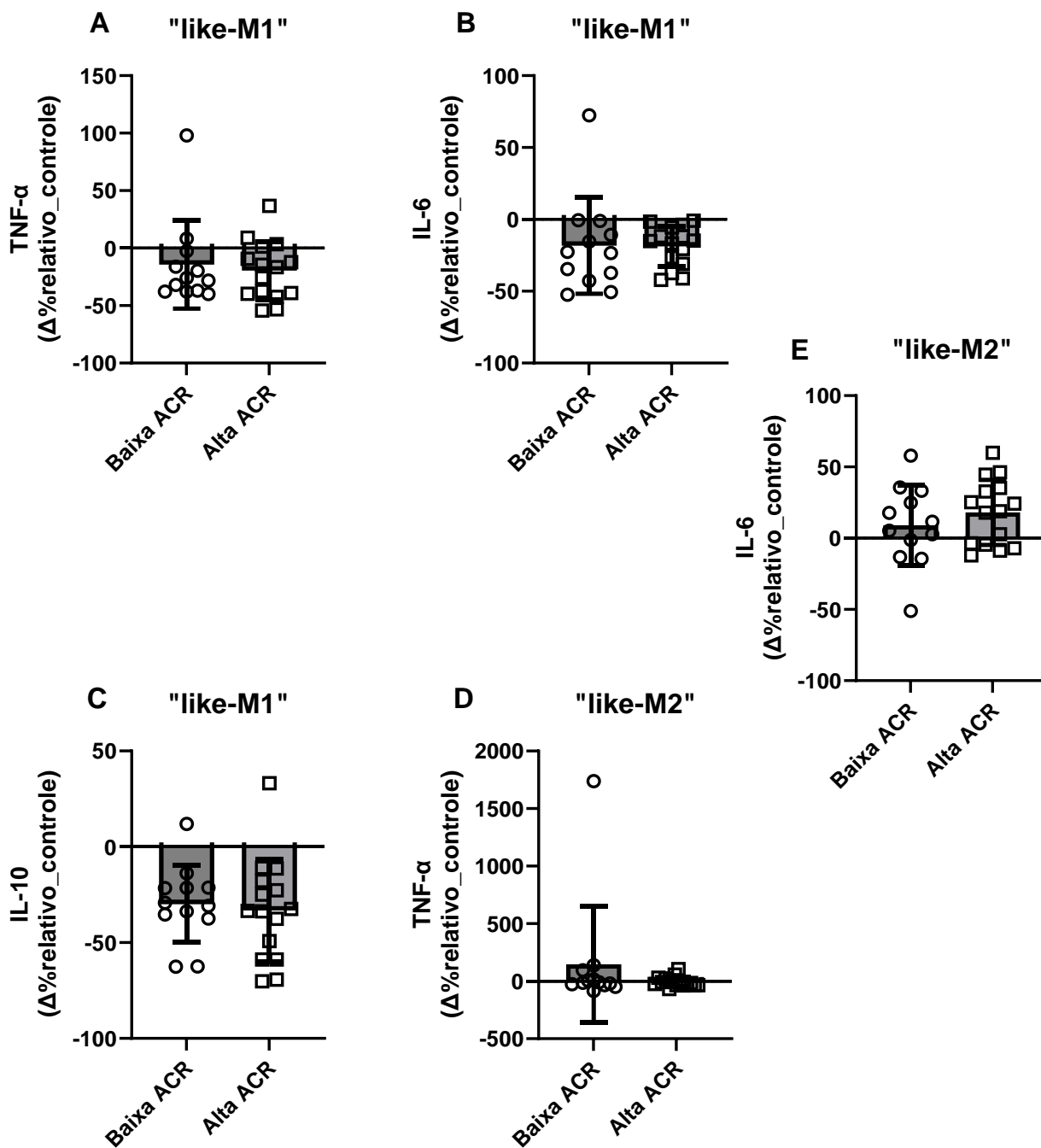


**Figura 12.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com os subgrupos experimentais.  $p\text{-GV}$  = Análises ajustadas pela gordura visceral.

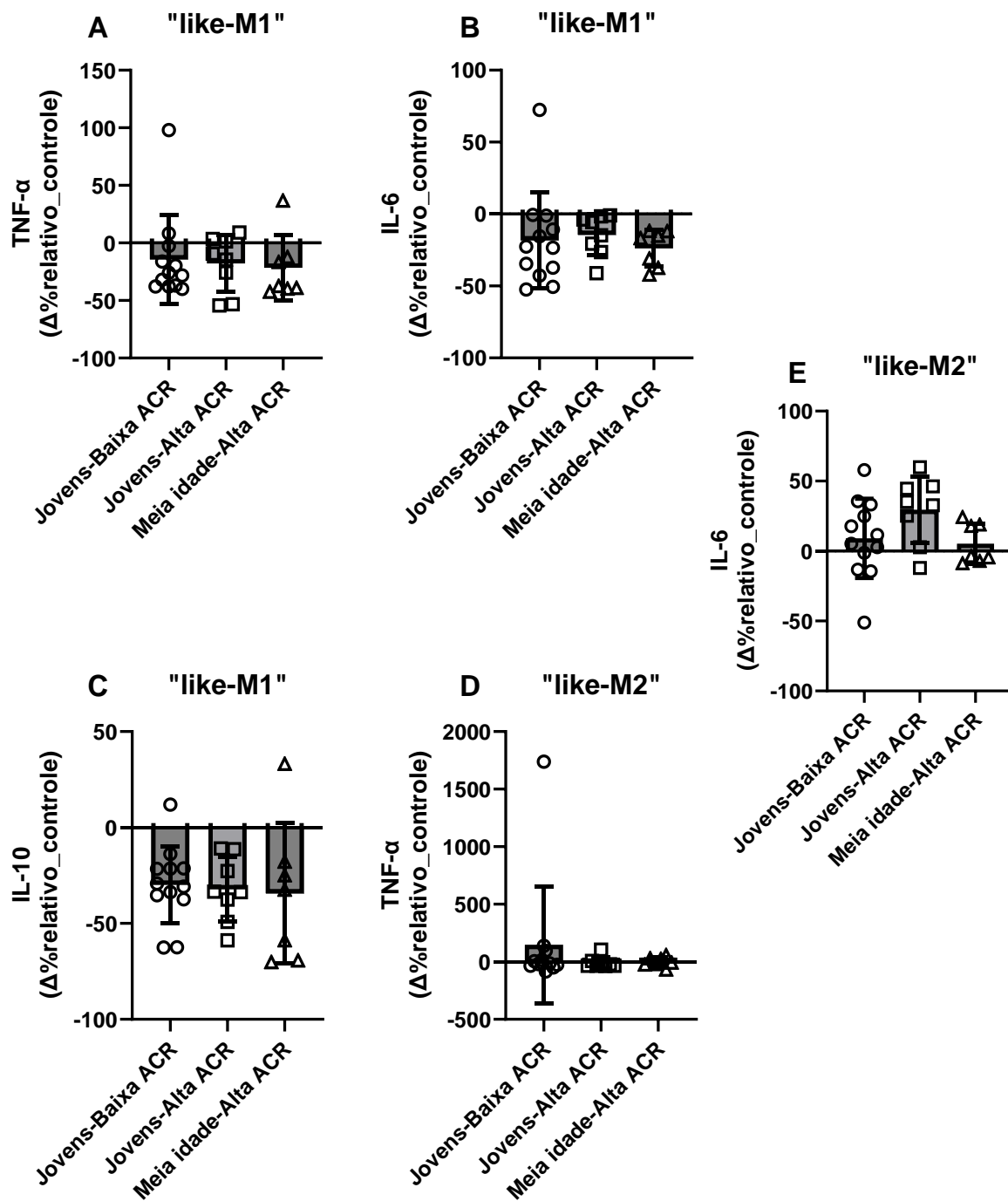
A fim de entender a magnitude da alteração, foram calculadas as alterações percentuais na liberação das citocinas relativas à condição controle sem o ativador da AMPK. Não houve diferenças entre indivíduos com baixa e alta ACR para todas as citocinas analisadas, [IL-6: “like M1” - Wald (1) = 0,126;  $p = 0,723$ ; IL-6: “like M2” - Wald (1) = 3,423;  $p = 0,064$ ], [TNF- $\alpha$ : “like M1” - Wald (1) = 0,082;  $p = 0,775$ ; TNF- $\alpha$ : “like M2” - Wald (1) = 1,219;  $p = 0,270$ ] e [IL-10: “like M1” - Wald (1) = 0,445;  $p = 0,505$ ] (Figura 13). Também não houve diferenças entre os subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR para todas as citocinas analisadas, [IL-6: “like M1”

- Wald (2) = 0,605;  $p = 0,739$ ; IL-6: “like M2” - Wald (2) = 5,223;  $p = 0,073$ ], [TNF- $\alpha$ : “like M1” - Wald (2) = 0,253;  $p = 0,881$ ; TNF- $\alpha$ : “like M2” - Wald (2) = 1,449;  $p = 0,485$ ] e [IL-10: “like M1” - Wald (2) = 0,175;  $p = 0,916$ ], mesmo após ajuste pela gordura visceral [IL-6: “like M1” - Wald (2) = 0,841;  $p\text{-GV} = 0,657$ ; IL-6: “like M2” - Wald (1) = 3,175;  $p\text{-GV} = 0,204$ ], [TNF- $\alpha$ : “like M1” - Wald (2) = 1,323;  $p\text{-GV} = 0,516$ ; TNF- $\alpha$ : “like M2” - Wald (2) = 0,487;  $p\text{-GV} = 0,784$ ] e [IL-10: “like M1” - Wald (2) = 0,646;  $p\text{-GV} = 0,724$ ] (Figura 14). Esses resultados confirmam que a magnitude de redução no lançamento de citocinas em monócitos polarizados para o fenótipo “like-M1”, acompanhada pela ativação da AMPK, foi similar entre indivíduos com diferentes *status* da ACR, independentemente da idade dos indivíduos com alta ACR.

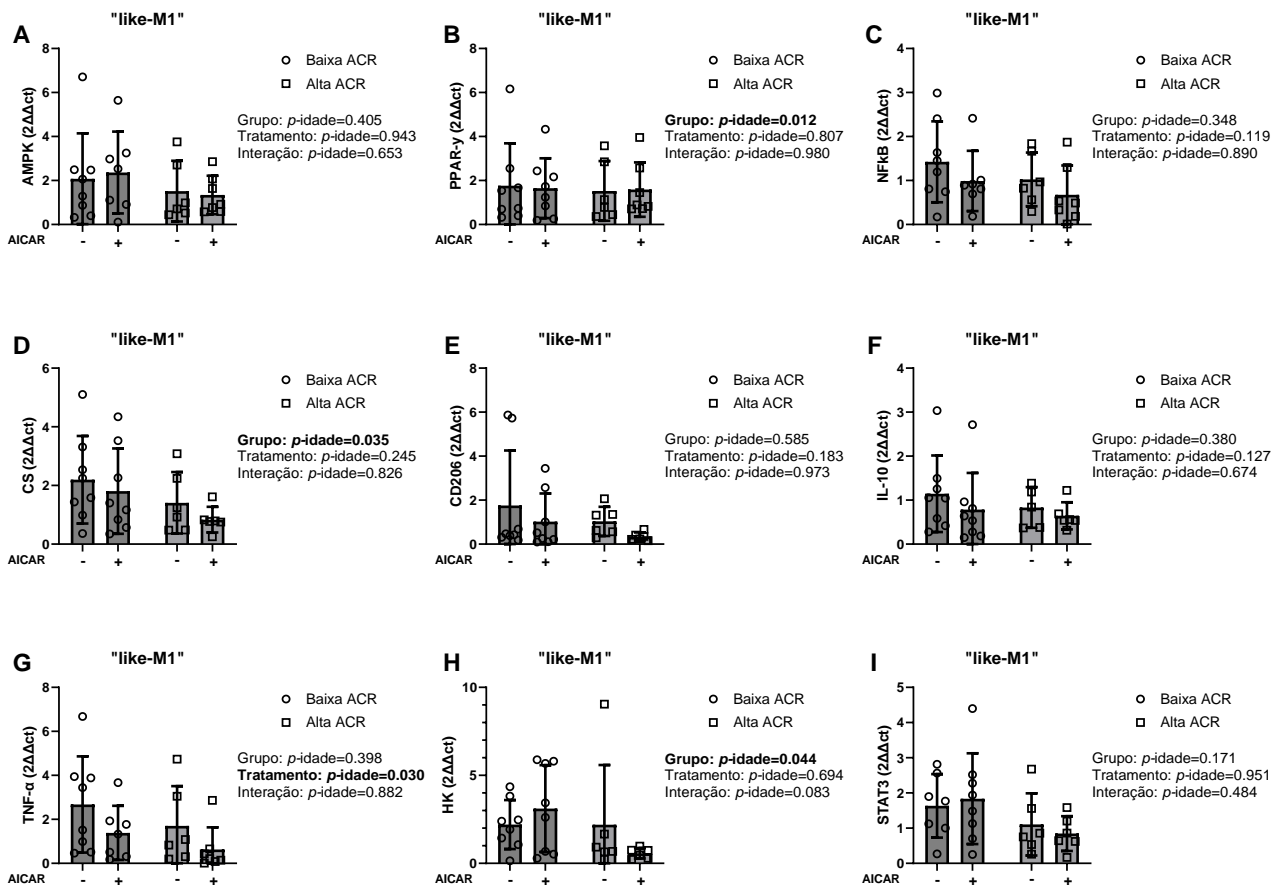
Quando analisada a expressão genica, a ativação da AMPK aumentou a expressão do marcador fenotípico anti-inflamatório CD206 em células “like-M2” [Efeito principal de tratamento: Wald (1) = 8,238;  $p\text{-idade} = 0,004$ ] (Figura 16E) e diminuiu a expressão do TNF- $\alpha$  em células “like-M1” [Efeito principal de tratamento: Wald (1) = 4,696;  $p\text{-idade} = 0,030$ ] (Figura 15G), independentemente do nível de ACR. Por outro lado, houve efeito de grupo [Wald (1) = 4,114;  $p\text{-idade} = 0,043$ ] associado a interação grupo\*tratamento [Wald (1) = 4,557;  $p\text{-idade} = 0,033$ ] na expressão da IL-10 em células “like-M2”, com o post-hoc detectando tendência para maior expressão após ativação da AMPK em indivíduos com baixa ACR quando comparado com indivíduos com alta ACR ( $p\text{-idade} = 0,098$ ), embora esse resultado pareça ter sido influenciado pela variação amostral (Figura 16F). Por fim, não houve diferenças significantes de tratamento ou interação entre grupo\*tratamento para os outros genes analisados (ver detalhes nas Figuras 15 e 16).



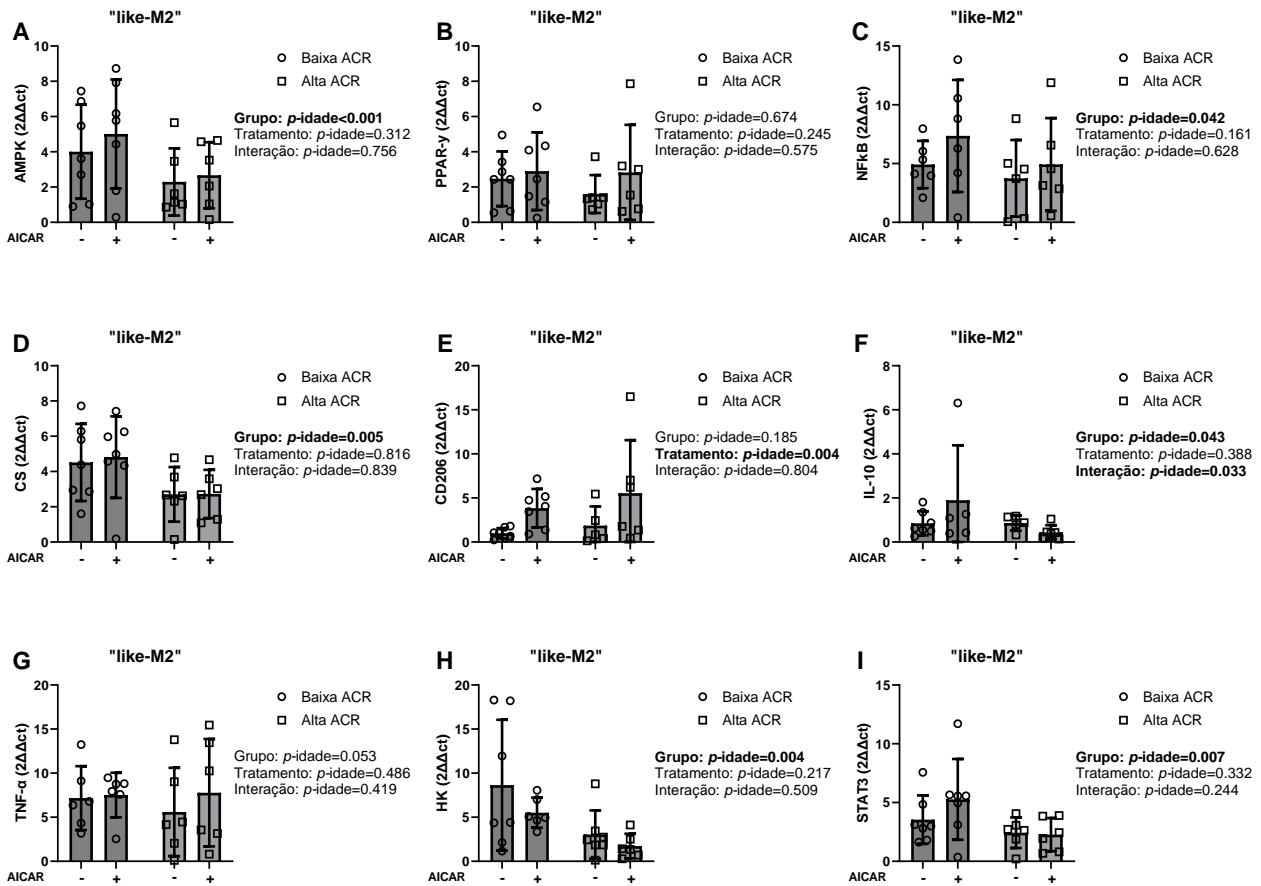
**Figura 13.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). O delta percentual relativo ao poço controle (não estimulado com AICAR) das concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 do sobrenadante de cultura após polarização é apresentado de acordo com os grupos experimentais.



**Figura 14.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para os fenótipos “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). O delta percentual relativo ao poço controle (não estimulado com AICAR) das concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 do sobrenadante de cultura após polarização é apresentado de acordo com os subgrupos experimentais.



**Figura 15.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M1” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). A expressão gênica de diferentes genes foi analisada após polarização e apresentada de acordo com o status da ACR.  $p$ -idade = Análises ajustadas pela idade.



**Figura 16.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR). A expressão gênica de diferentes genes foi analisada após polarização e apresentada de acordo com o status da ACR.  $p$ -idade = Análises ajustadas pela idade.

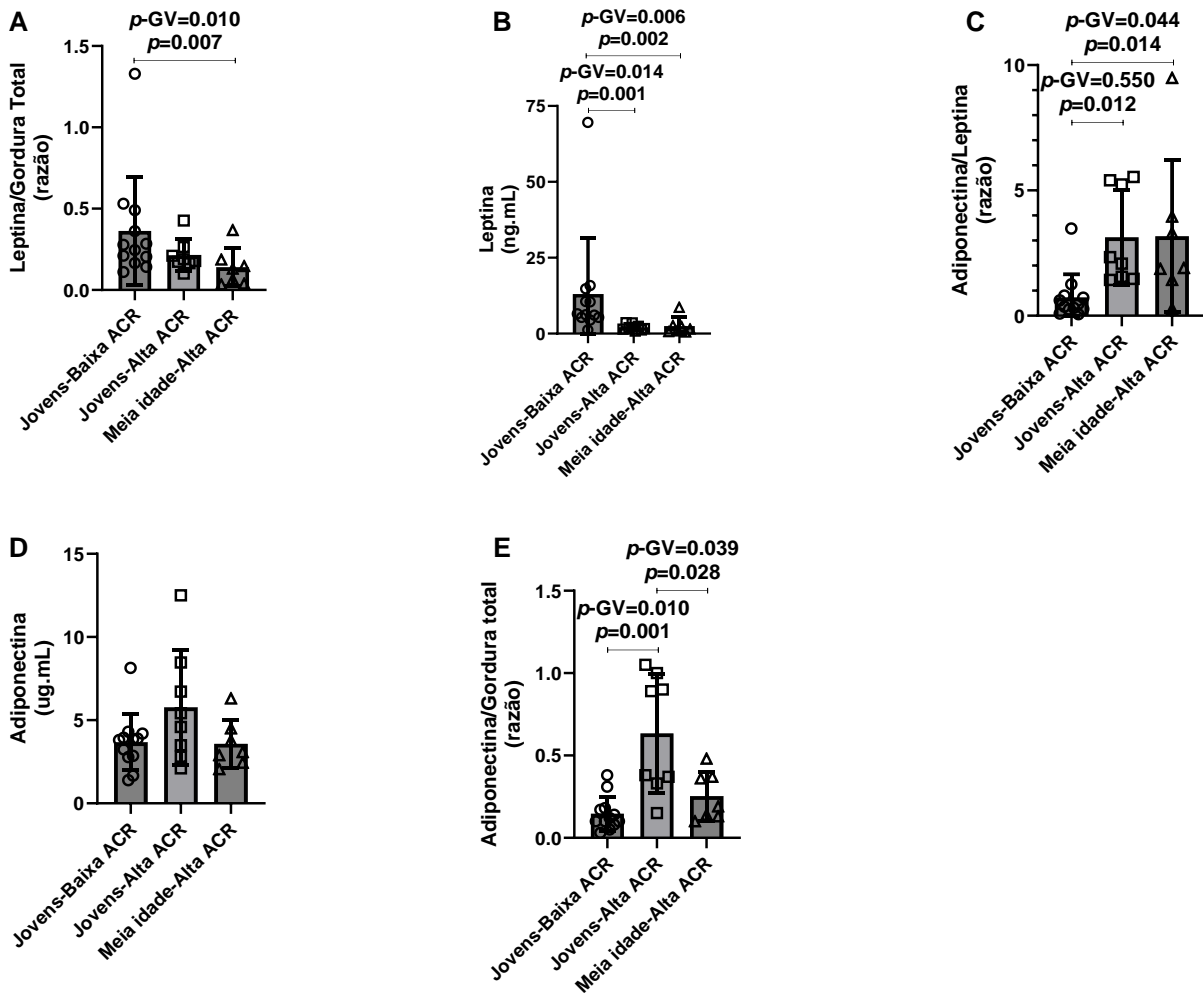
Em resumo, embora indivíduos com baixa ACR apresentaram um fenótipo de monócitos mais pró-inflamatório após polarização, a ativação da AMPK durante a polarização engrenou similar resposta anti-inflamatória em indivíduos com baixa e alta ACR, entretanto, especialmente no contexto mais pró-inflamatório, como naquele em que monócitos são polarizados para o fenótipo “like-M1”.

**Objetivo 2: Exposição à leptina estimula fenótipo pró-inflamatório após polarização dos monócitos de indivíduos com baixa ACR, mas não alta ACR**

É conhecido que o tecido adiposo diretamente modula o estado de ativação das células imunológicas, em partes, através da liberação da leptina. Desta forma, verificou-se se a polarização dos monócitos, em resposta à sinalização molecular imposta pelo tecido adiposo (leptina), difere de acordo

com o nível da ACR. Para isso, os monócitos foram polarizados para o fenótipo “like-M1” e “like-M2”, na ausência ou presença de diferentes concentrações de leptina, e o perfil inflamatório dessas células foi analisado em indivíduos com baixa e alta ACR.

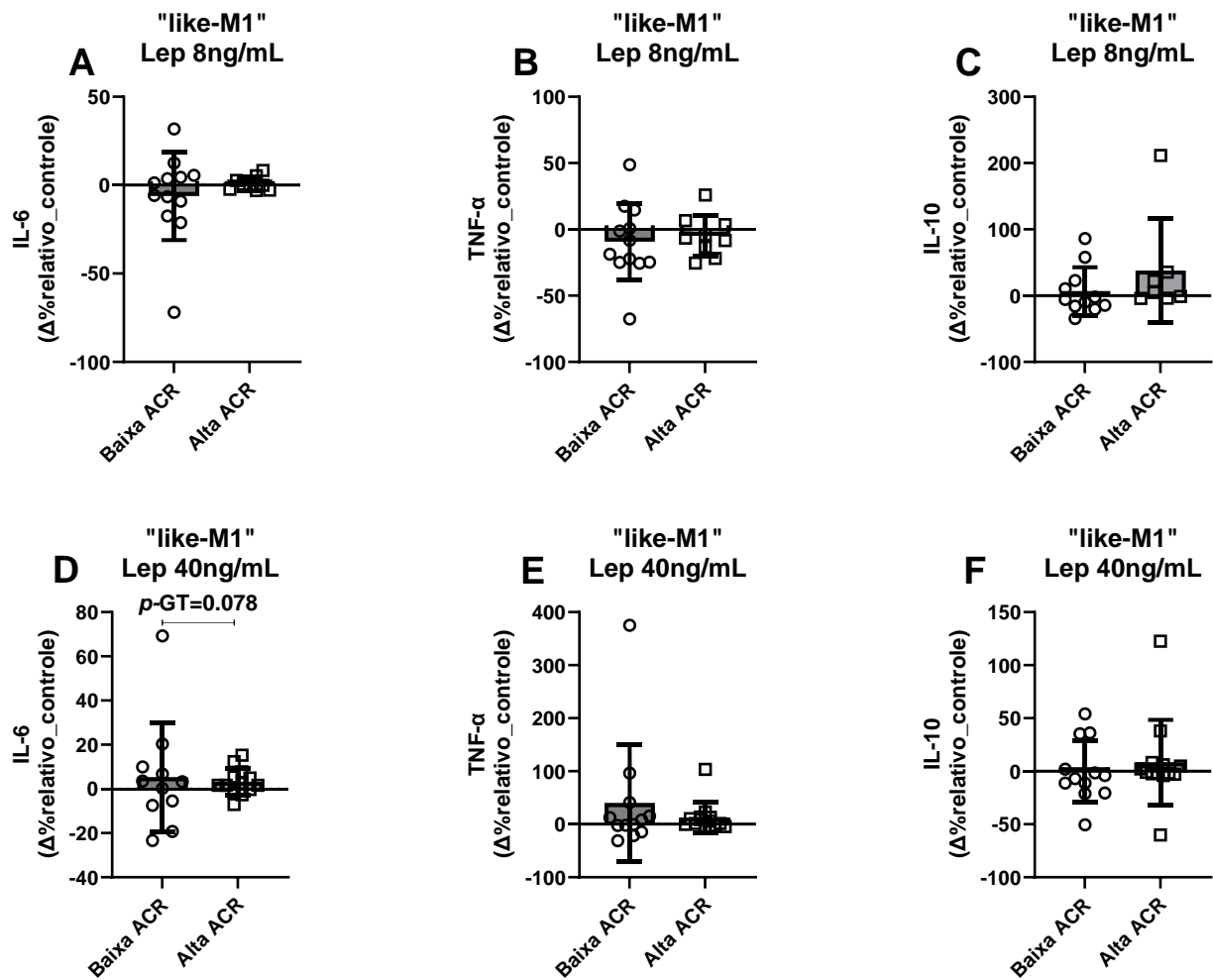
Inicialmente, foi verificada se a liberação estimada de leptina pelo tecido adiposo (razão leptina/gordura corporal) e as concentrações sistêmicas da leptina eram diferentes entre os subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR, a fim de se apropriar das diferenças entre os grupos com alta ACR (indivíduos jovens e com meia idade) e as possíveis limitações da análise desses indivíduos em conjunto. A razão leptina/gordura corporal do subgrupo Jovens-Baixa ACR foi maior que do subgrupo Meia idade-Alta ACR ( $p = 0,007$ ;  $p\text{-GV} = 0,010$ ), mas não diferiu do subgrupo Jovens-Alta ACR ( $p = 0,196$ ;  $p\text{-GV} = 0,422$ ) (Figura 17A). A similaridade na razão leptina/gordura corporal também foi encontrada entre os subgrupos Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR ( $p = 0,602$ ;  $p\text{-GV} = 0,635$ ) (Figura 17A). Adicionalmente, as concentrações sistêmicas de leptina dos subgrupos Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR foram similares ( $p = 1,000$ ;  $p\text{-GV} = 0,983$ ), ao passo que o subgrupo Jovens-Baixa ACR apresentou maior concentração quando comparado com Jovens-Alta ACR ( $p = 0,001$ ;  $p\text{-GV} = 0,014$ ) e Meia idade-Alta ACR ( $p = 0,002$ ;  $p\text{-GV} = 0,006$ ) (Figura 12B) (Figura 17B). Como esperado, o controle pela massa de gordura corporal total interferiu significativamente nas comparações das concentrações de leptina ( $p\text{GT} < 0,001$ ) e anulou o efeito principal entre os grupos [Wald (2) = 3,064;  $p\text{-GT} = 0,216$ ]. Desta forma, as análises da ação da leptina sobre a polarização dos monócitos foram desenvolvidas com ajuste para a massa de gordura total. Para isso, a estimulação com leptina foi realizada nas concentrações de 8 e 40 ng/mL, geralmente encontradas em indivíduos eutróficos e com obesidade, respectivamente.



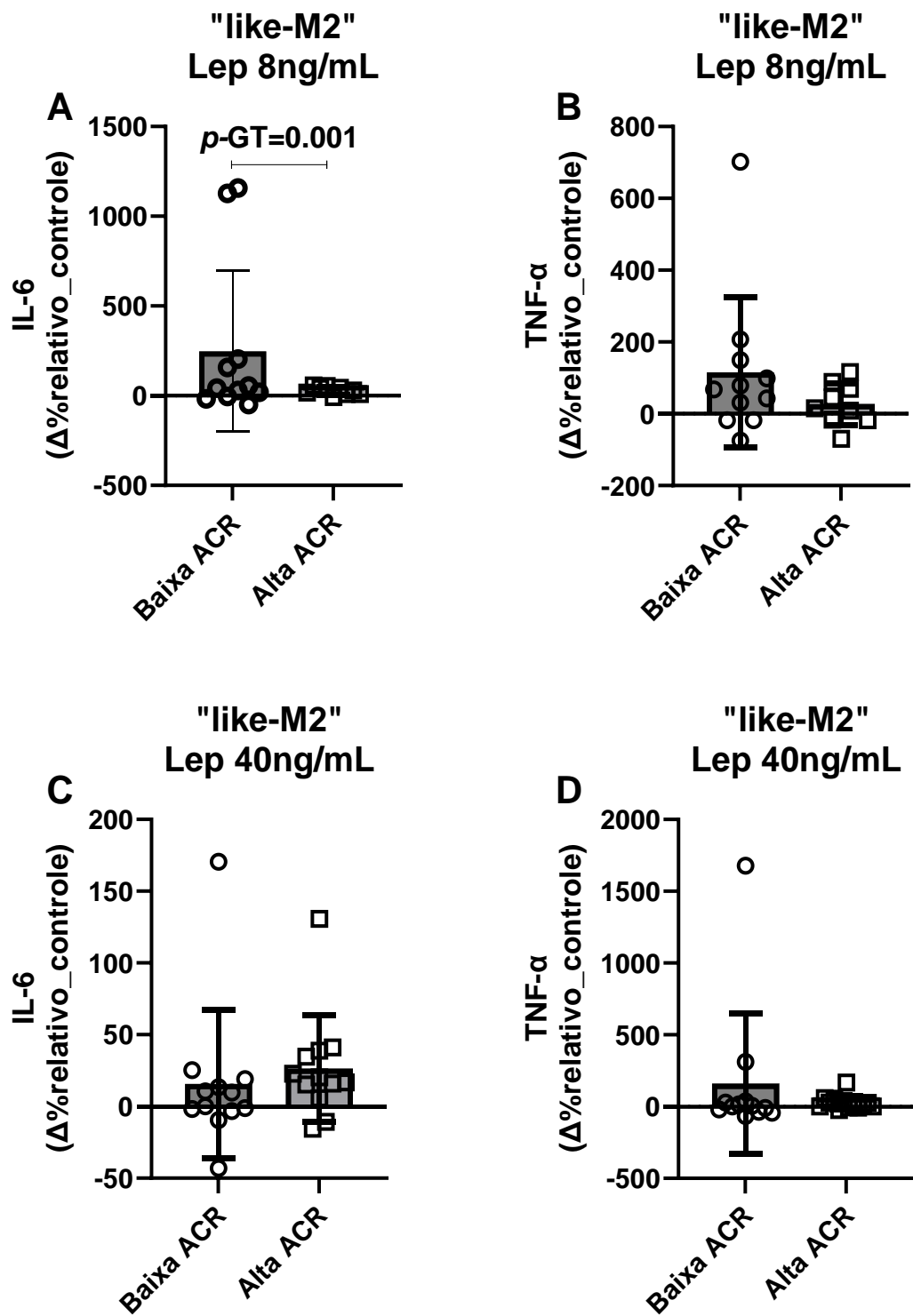
**Figura 17.** Diferença nas concentrações da leptina, adiponectina e razão dessas adipocinas com a quantidade do tecido adiposo branco total nos subgrupos experimentais.  $p\text{-GV}$  = Análises ajustadas pela gordura visceral.

A magnitude das alterações na liberação das citocinas seguindo a polarização dos monócitos na presença da leptina, relativo aos monócitos polarizados na ausência deste hormônio, são apresentadas na **Figura 18 e 19**. A liberação da IL-6, após polarização dos monócitos para o fenótipo “like-M2” acompanhada com 8 ng/mL de leptina, foi maior em indivíduos com baixa ACR [**Wald (1) = 10,274;  $p\text{-GT} = 0,001$** ] (**Figura 19A**). Também foi observado aumento marginal na liberação da IL-6, após polarização dos monócitos para o fenótipo “like-M1” acompanhada com 40 ng/mL de leptina, em indivíduos com baixa ACR [**Wald (1) = 3,113;  $p\text{-GT} = 0,078$** ], embora com grande variação na resposta (**Figura 18D**). Esses resultados são parcialmente corroborados pela correlação positiva, de

magnitude moderada e com uma variância compartilhada (coeficiente de determinação) de 36,96%, observada entre as concentrações sistêmicas de leptina e a liberação de IL-6 por monócitos “like-M1”, identificada exclusivamente em indivíduos com baixa ACR ( $r = 0,608$ ;  $p = 0,040$ ) (**Tabela 4**). Por outro lado, não houve diferenças estatisticamente significantes para a liberação do TNF- $\alpha$  e IL-10 após polarização para o fenótipo “like-M1” acompanhada com 8 ng/mL ( $pGT = 0,300$  e  $0,224$ , **Figura 18B e C, respectivamente**) e 40 ng/mL ( $pGT = 0,789$  e  $0,651$ , **Figura 18E e F, respectivamente**) de leptina, bem como na liberação da IL-6 após polarização para o mesmo fenótipo acompanhada com 8 ng/mL da leptina ( $pGT = 0,379$ ) (**Figura 18A**). Os grupos também não diferiram após polarização para o fenótipo “like-M2” acompanhada com 40 ng/mL de leptina na liberação da IL-6 e TNF- $\alpha$  ( $pGT = 0,862$  e  $0,464$ , **Figura 19C e D, respectivamente**) e com 8 ng/mL de leptina na liberação do TNF- $\alpha$  ( $pGT = 0,962$ ) (**Figura 19B**). Assim, a polarização dos monócitos de indivíduos com diferentes status de ACR parece ser controlada diferencialmente pela leptina, com ausência da indução pró-inflamatória naqueles com alta ACR.



**Figura 18.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M1” por 24 horas associado ao tratamento com diferentes concentrações de leptina. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas integralmente ou relativas (delta percentual) de acordo com o status da ACR. *p*-GT = Análises ajustadas pela gordura total.



**Figura 19.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com diferentes concentrações de leptina. As concentrações do TNF- $\alpha$  e IL-6 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas integralmente ou relativas (delta percentual) de acordo com o status da ACR.  $p\text{-GT}$  = Análises ajustadas pela gordura total.

**Tabela 4.** Correlação entre as concentrações sistêmicas da leptina e liberação das citocinas em monócitos “like-M1” e “like-M2”

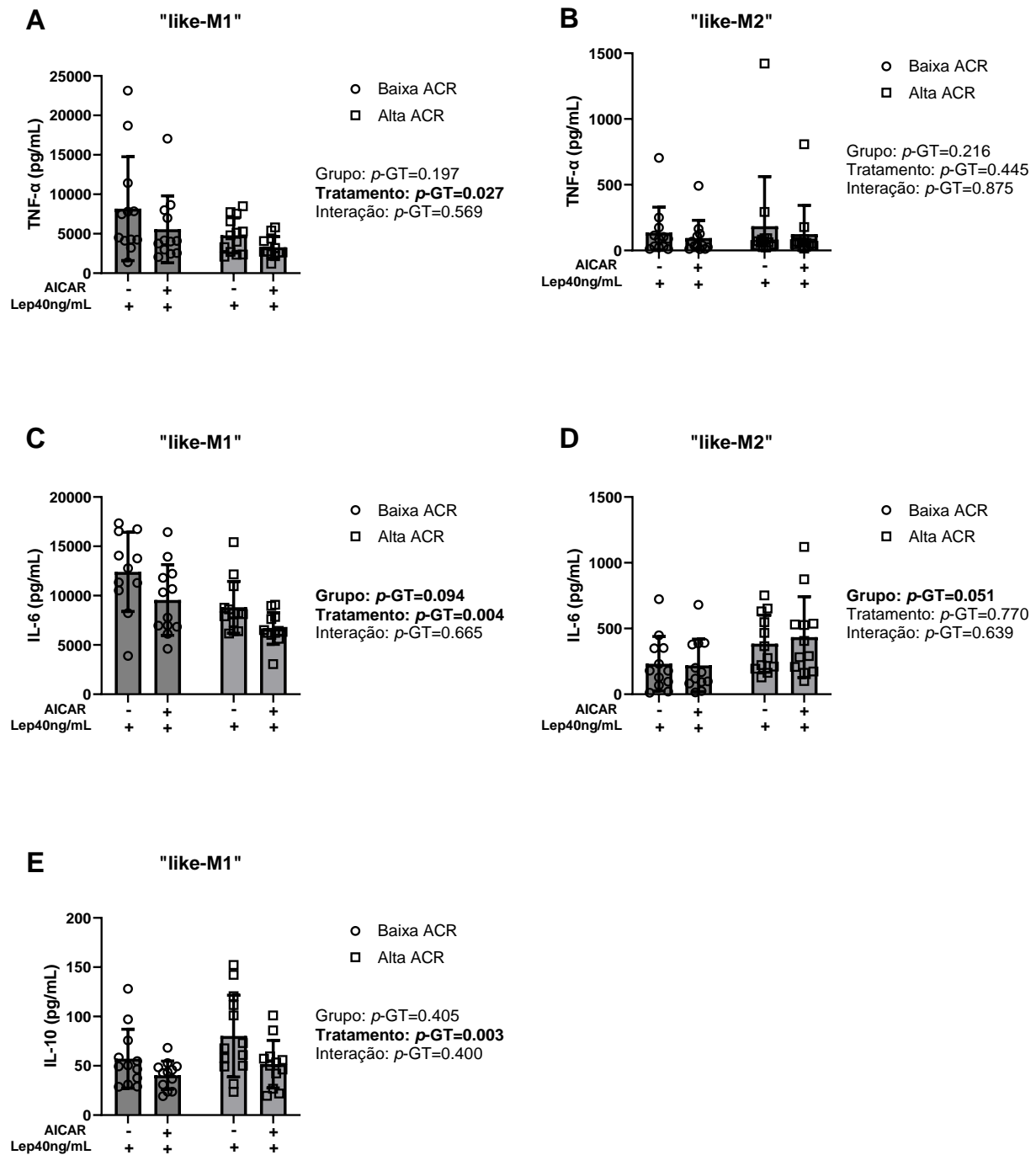
<b>Alta ACR</b>		<b>r de Spearman</b>	<b>Sig (p)</b>
Leptina (ng/mL)	TNF- $\alpha$ _ M1	-0.111	0,695
	TNF- $\alpha$ _ M2	-0.071	0,802
	IL-6_ M1	-0.229	0,411
	IL-6_ M2	-0.275	0,320
	IL-10_ M1	-0.089	0,753
<b>Baixa ACR</b>			
Leptina (ng/mL)	TNF- $\alpha$ _ M1	0.028	0,939
	TNF- $\alpha$ _ M2	-0.147	0,651
	<b>IL-6_ M1</b>	<b>0.608</b>	<b>0,040</b>
	IL-6_ M2	-0.210	0,514
	IL-10_ M1	-0.102	0,753

**Objetivo 2 (extensão): Ação anti-inflamatória da AMPK na polarização para o fenótipo “like-M1” permanece, mesmo na presença da leptina**

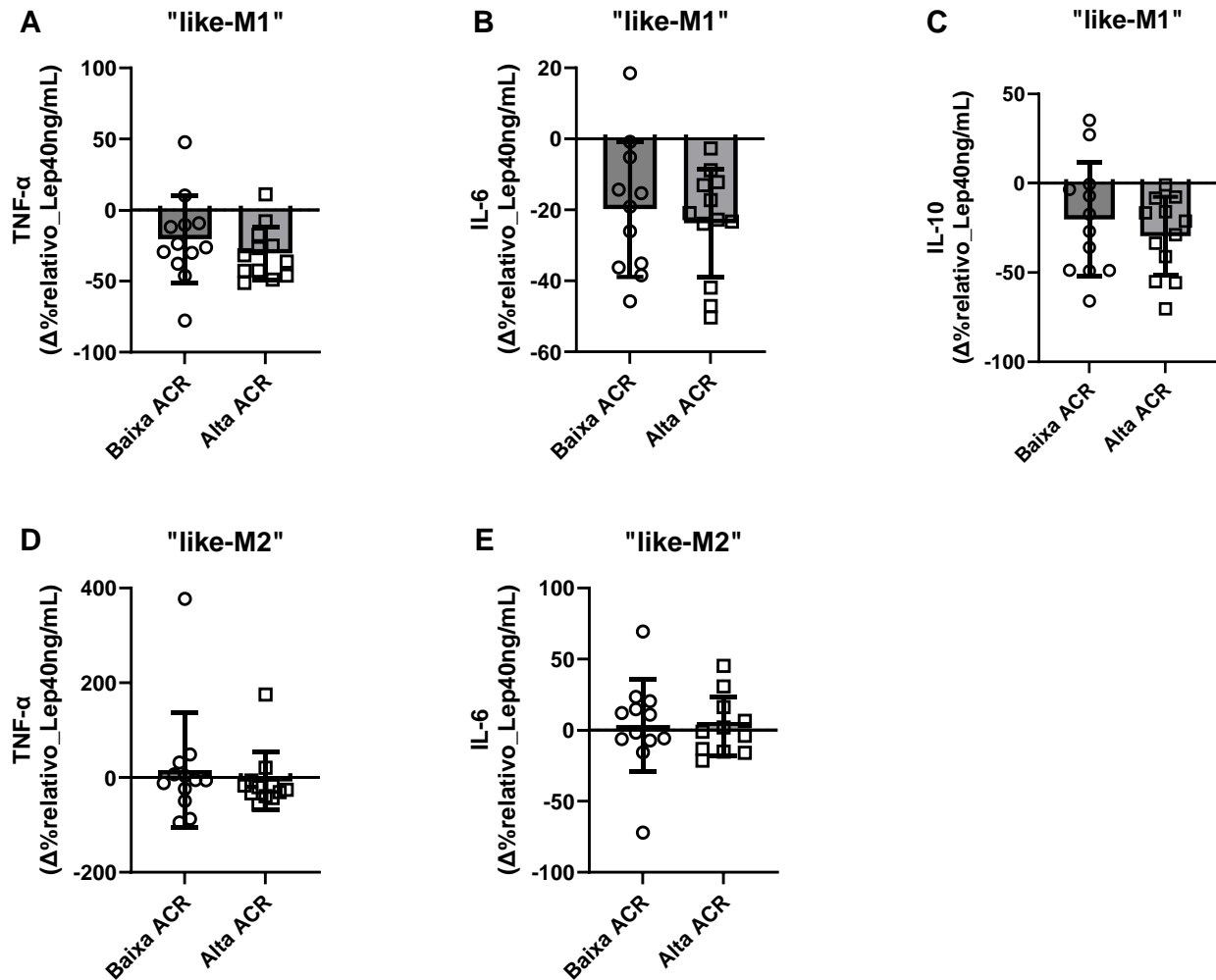
Levando em conta a ação anti-inflamatória da AMPK, foi verificado se sua ativação poderia regular a resposta inflamatória durante a polarização dos monócitos na presença da leptina, especialmente dos indivíduos com baixa ACR. Para isso, a polarização dos monócitos para os fenótipos “like-M1” e “like-M2”, associada a leptina, foi realizada com o ativador da AMPK (AICAR). Como anteriormente demonstrado que os indivíduos com baixa ACR apresentaram elevada massa de gordura corporal total (**Tabela 1 e 2**), o tratamento com 40 ng/mL de leptina foi mantido para o experimento e o controle pela massa de gordura corporal total novamente aplicado nas análises.

A ativação da AMPK associada à leptina reduziu a liberação do TNF- $\alpha$  [**Efeito principal de tratamento: Wald (1) = 4,891; p-GT = 0,027**] (**Figura 20A**), IL-6 [**Efeito principal de tratamento: Wald (1) = 8,504; p-GT = 0,004**] (**Figura 20C**) e IL-10 [**Efeito principal de tratamento: Wald (1) = 8,892; p-GT = 0,003**] (**Figura 20E**) em monócitos polarizados para o fenótipo “like-M1”, independentemente do nível da ACR. Não houve diferenças significantes para a liberação do TNF- $\alpha$  e IL-6 em monócitos “like-M2” (**Figura 20B e 20D, respectivamente**) e a magnitude de redução das citocinas foi semelhante entre os grupos (**Figura 21**).

Dessa forma, embora a leptina estimule um fenótipo mais pró-inflamatório após polarização dos monócitos em indivíduos com baixa ACR, a ativação da AMPK diminui a atividade pró-inflamatória dos monócitos “like-M1” mesmo na presença desse hormônio.



**Figura 20.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR) e diferentes concentrações de leptina. As concentrações do TNF-α, IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após polarização e apresentadas de acordo com o status da ACR.  $p$ -GT = Análises ajustadas pela gordura total.



**Figura 21.** Monócitos CD14<sup>+</sup> foram polarizados para o fenótipo “like-M1” e “like-M2” por 24 horas associado ao tratamento com o ativador da AMPK (AICAR) e 40 ng/mL de leptina. O delta percentual, relativo às células tratadas com 40 ng/mL de leptina (não estimuladas com AICAR), das concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 do sobrenadante da cultura após polarização é apresentado de acordo com o status da ACR.

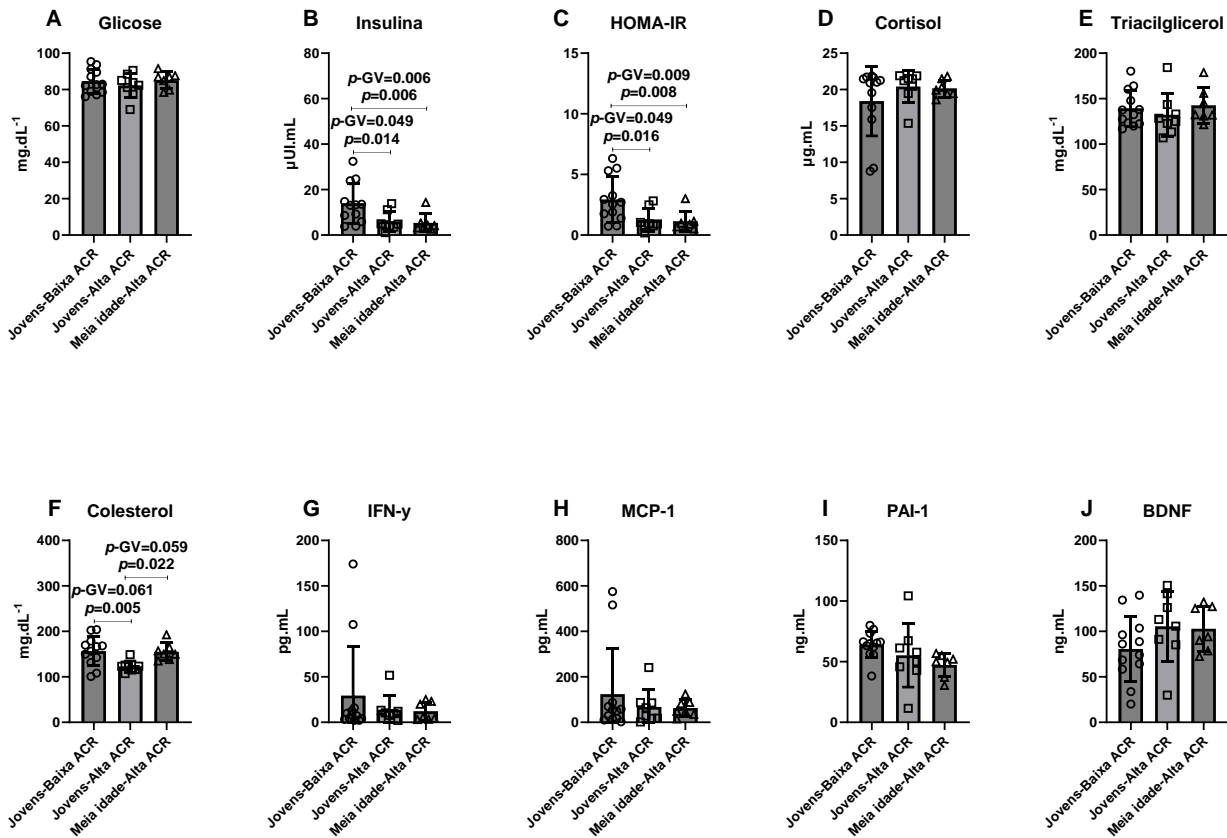
### Impacto da ACR no perfil inflamatório sistêmico e resposta inflamatória entre as células imunológicas

É conhecido que o ambiente em que os monócitos são expostos pode ser determinante para guiar seu fenótipo após polarização, portanto foram realizadas análises exploratórias sistêmicas e da resposta inflamatória das células imunológicas dos subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia Idade-Alta ACR, para compreender melhor as alterações encontradas após polarização.

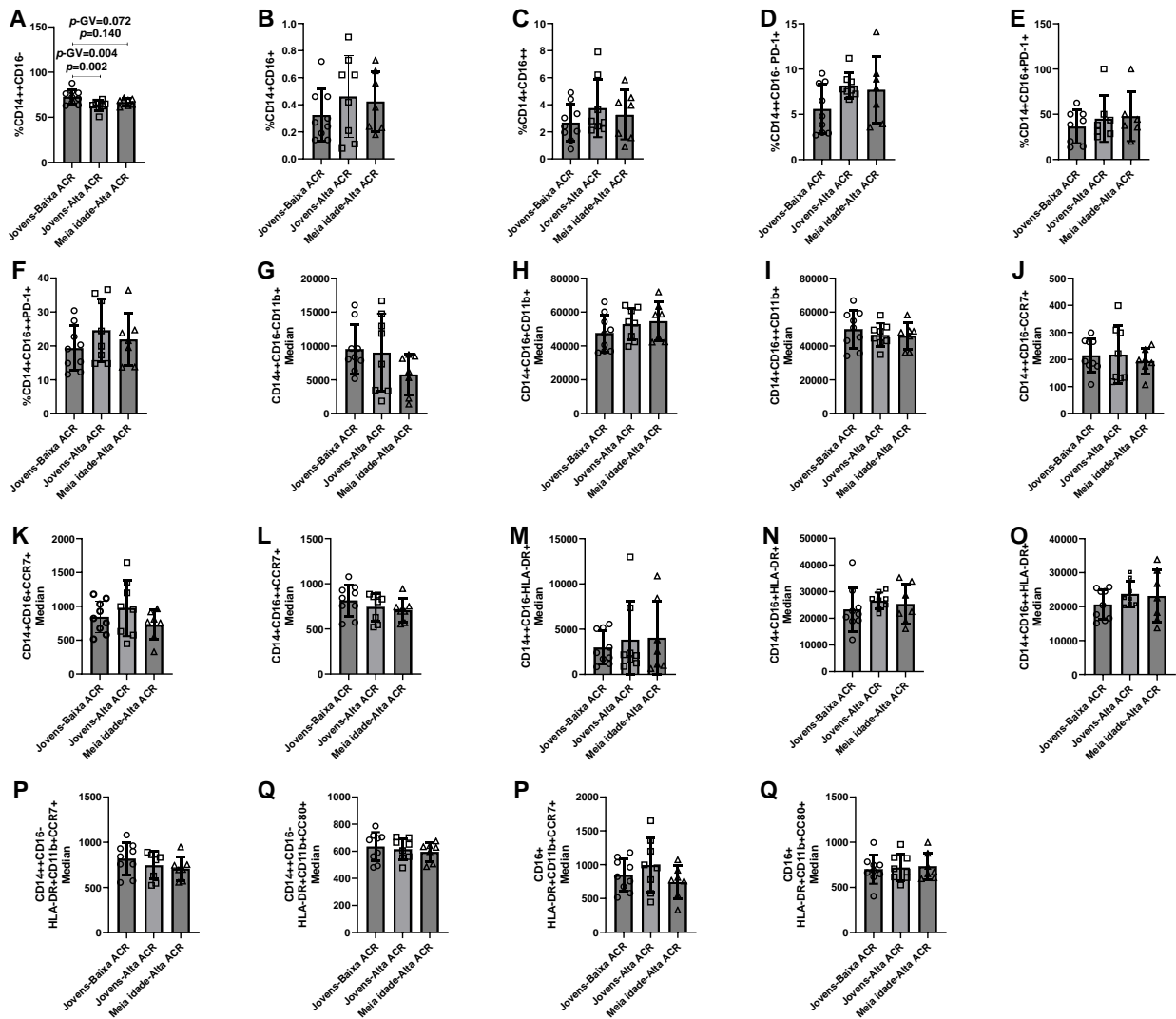
Além da maior concentração da leptina no sangue periférico anteriormente demonstrada (**Figura 17B**), o subgrupo Jovens-Baixa ACR apresentou maior concentração de insulina que o subgrupo Jovens-Alta ACR ( $p = 0,014$ ;  $p\text{-GV} = 0,049$ ) e Meia Idade-Alta ACR ( $p = 0,006$ ;  $p\text{-GV} = 0,006$ ) (**Figura 22B**) e maior HOMA-IR que o subgrupo Jovens-Alta ACR ( $p = 0,016$ ;  $p\text{-GV} = 0,049$ ) e Meia Idade-Alta ACR ( $p = 0,008$ ;  $p\text{-GV} = 0,009$ ) (**Figura 22C**). A concentração do colesterol foi maior no subgrupo Jovens-Baixa ACR comparado com o subgrupo Jovens-Alta ACR ( $p = 0,005$ ;  $p\text{-GV} = 0,061$ ). O subgrupo Meia Idade-Alta ACR também apresentou maior concentração do colesterol que o subgrupo Jovens-Alta ACR ( $p = 0,022$ ;  $p\text{-GV} = 0,059$ ), mas as diferenças se tornaram marginais quando controlado pela gordura visceral (**Figura 22F**). Adicionalmente, embora não houve diferenças entre os subgrupos nas concentrações sistêmicas da adiponectina (**Figura 17D**), a razão adiponectina/gordura total foi maior no subgrupo Jovens-Alta ACR comparado com os subgrupos Jovens-Baixa ACR ( $p = 0,001$ ;  $p\text{-GV} = 0,010$ ) e Meia Idade-Alta ACR ( $p = 0,028$ ;  $p\text{-GV} = 0,039$ ) (**Figura 17E**). Não houve diferenças entre os subgrupos nas concentrações sistêmicas de glicose, triacilglicerol, cortisol, IFN- $\gamma$ , MCP-1, PAI-1 e BDNF (**Figura 22**). Assim, indivíduos jovens com baixa ACR apresentaram ambiente sistêmico mais inflamatório, especialmente quando comparado com o subgrupo Jovens-Alta ACR.

O ambiente sistêmico mais inflamatório no subgrupo Jovens-Baixa ACR foi acompanhado com maior percentual de monócitos clássicos neste mesmo subgrupo quando comparado com Jovens-Alta ACR ( $p = 0,002$ ;  $p\text{-GV} = 0,004$ ), além da superioridade marginal quando ajustado pela gordura visceral comparado com o subgrupo Meia Idade-Alta ACR ( $p = 0,140$ ;  $p\text{-GV} = 0,072$ ) (**Figura 23A**). Adicionalmente, o subgrupo Jovens-Alta ACR apresentou maior frequência de células NK CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>, após ajuste pela gordura visceral, que o subgrupo Meia Idade-Alta ACR ( $p = 0,385$ ;  $p\text{-GV} = 0,043$ ) e superioridade marginal que o subgrupo Jovens-Baixa ACR ( $p = 0,655$ ;  $p\text{-GV} = 0,062$ ) (**Figura 24K**). Por outro lado, não houve efeitos principais de grupo no percentual de monócitos intermediários e não clássicos, expressão dos marcadores de ativação (HLA-DR, CD11b, CD80), quimiotaxia (CCR7)

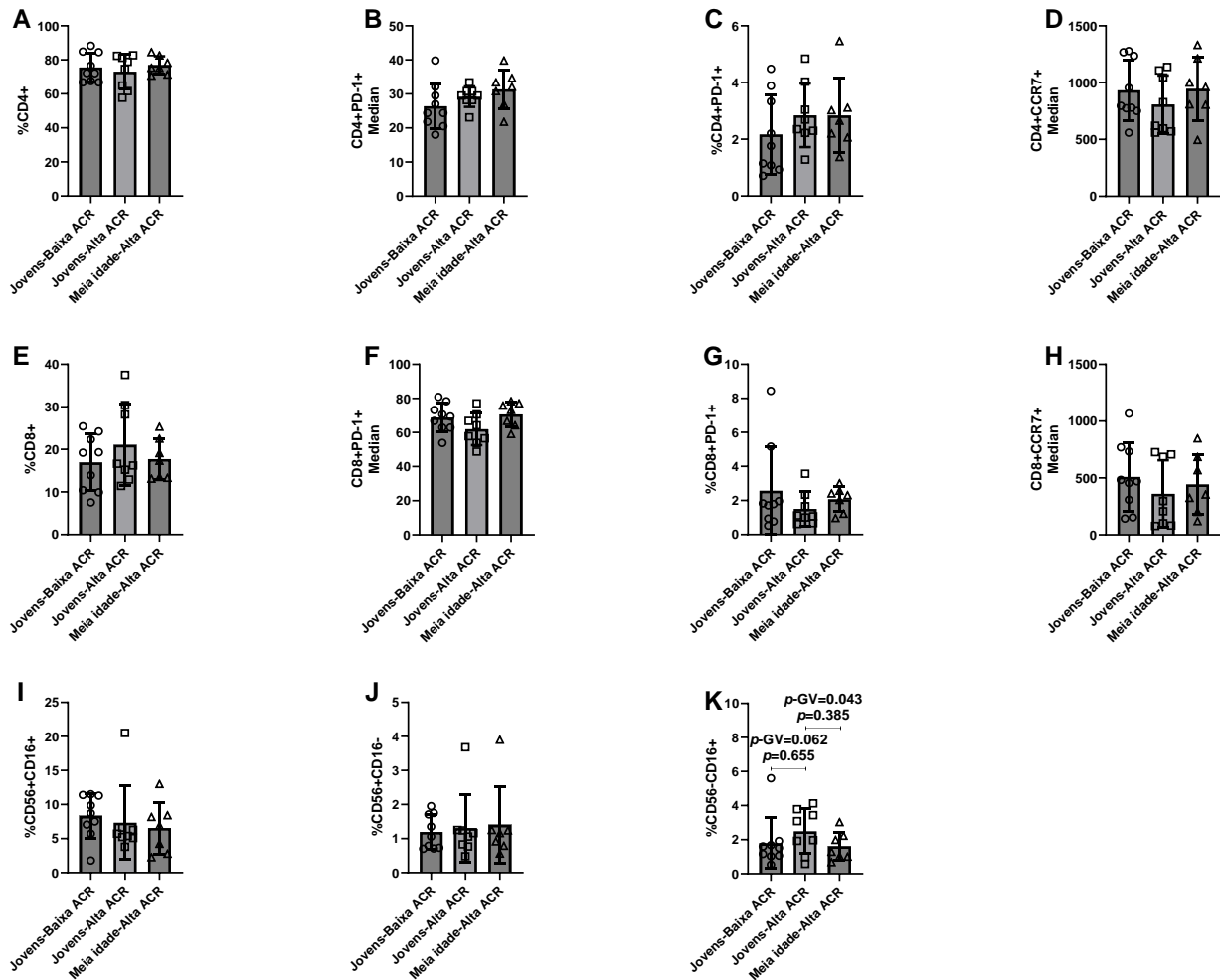
e exaustão (PD-1) nas subpopulações dos monócitos, percentual de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e expressão de PD-1 e CCR7 nessas células, bem como na frequência de células NK CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (Figura 23 e 24). Assim, os resultados sugerem que o *status* da ACR está relacionado a diferenças nas subpopulações de monócitos e células NK circulantes.



**Figura 22.** Perfil inflamatório/metabólico sistêmico dos subgrupos experimentais. *p*-GV = Análises ajustadas pela gordura visceral.



**Figura 23.** Fenotipagem das subpopulações dos monócitos de acordo com os subgrupos experimentais. *p*-GV = Análises ajustadas pela gordura visceral.



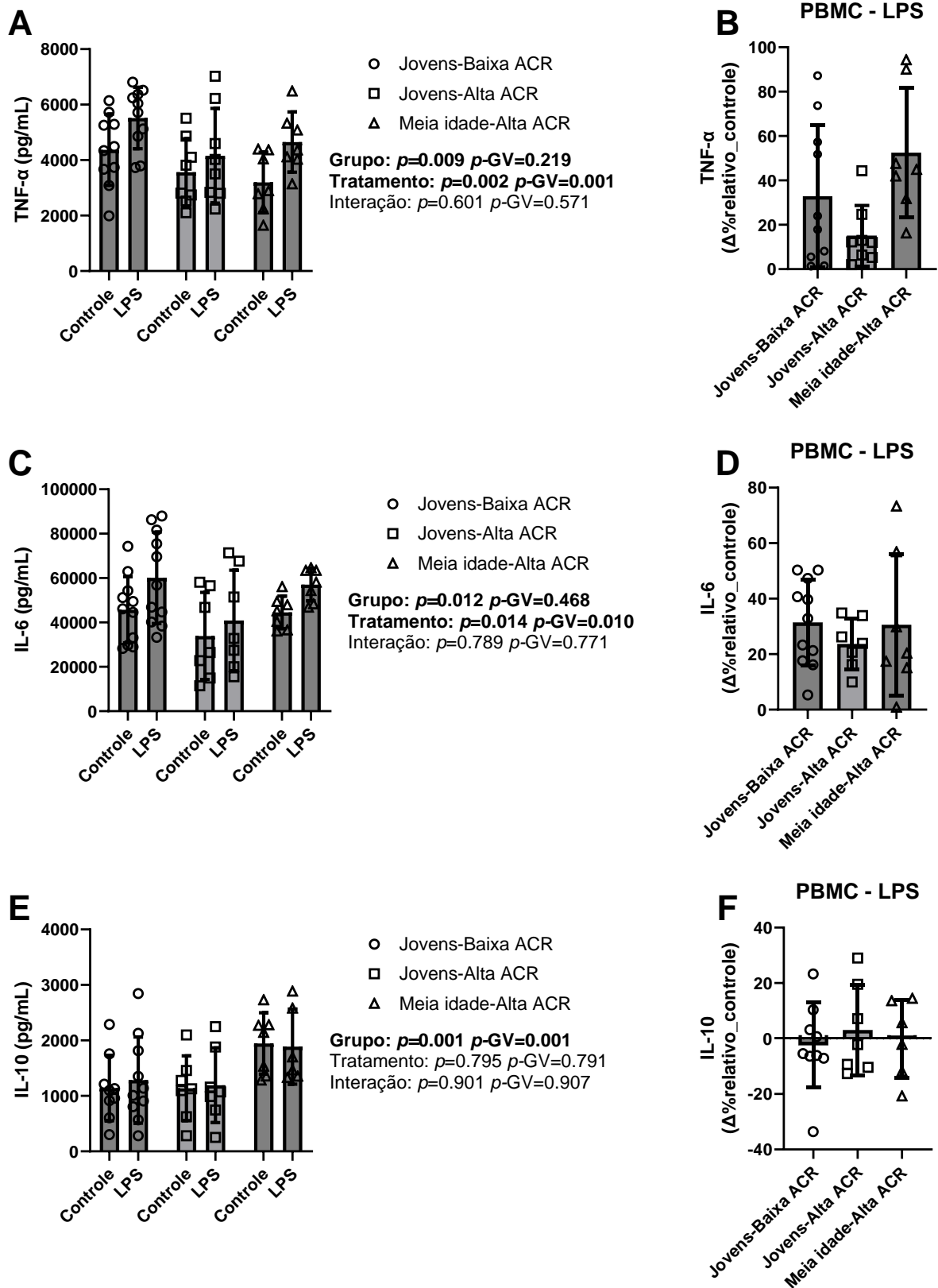
**Figura 24.** Fenotipagem das subpopulações de linfócitos de acordo com os subgrupos experimentais. *p*-GV = Análises ajustadas pela gordura visceral.

Por fim, foi realizada a cultura dos monócitos com outras células imunológicas (cultura das PBMCs e ensaio do sangue total) a fim de verificar se o fenótipo inflamatório dessas células, anteriormente verificado, está acompanhando de um perfil inflamatório mais amplo. Como esperado, as PBMCs estimuladas com LPS apresentaram aumento nas concentrações do TNF- $\alpha$  e IL-6 (efeito principal de tratamento) e não houve diferenças na liberação da IL-10 (**Figura 25A, C e E, respectivamente**). Apesar dos efeitos principais de grupo nas concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, não houve qualquer efeito de interação entre grupo\*tratamento. Por outro lado, a **Figura 25** apresenta os efeitos principais de grupo, tratamento e interação grupo\*tratamento nas concentrações do INF- $\gamma$  e IL-10 das PBMCs estimuladas com PMA+ionomicina. O estímulo com PMA+ionomicina aumentou a

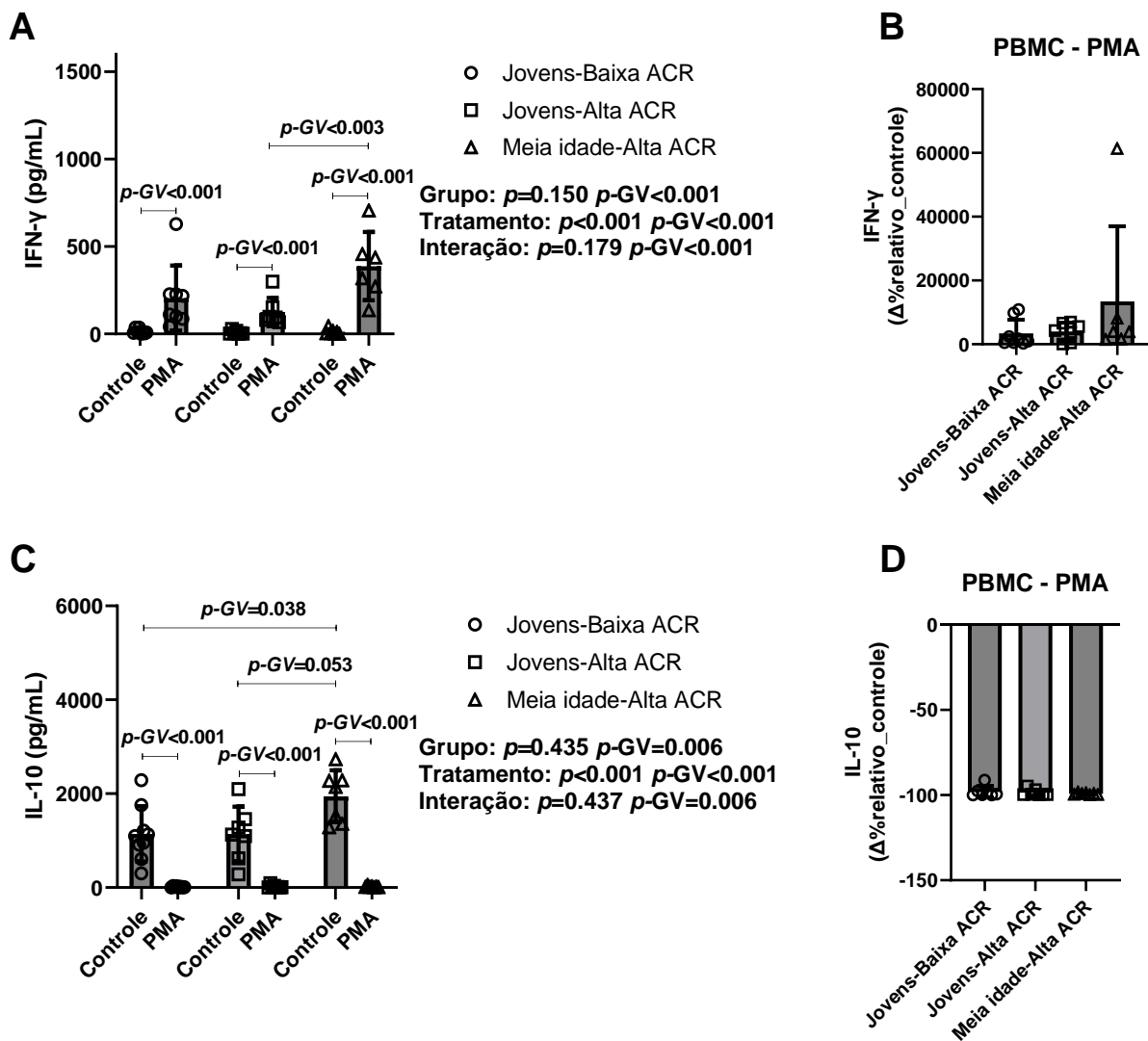
liberação do INF- $\gamma$  e reduziu a liberação da IL-10 em todos os subgrupos (**Figura 26A e C, respectivamente**). Adicionalmente, as PBMCs não estimuladas do subgrupo Meia idade-alta ACR apresentaram maior concentração de IL-10 que o subgrupo Jovens-baixa ACR ( $p\text{-GV} = 0,038$ ) e superioridade marginal que o subgrupo Jovens-alta ACR ( $p\text{-GV} = 0,053$ ) (**Figura 26C**). As PBMCs estimuladas do subgrupo Meia idade-alta ACR também apresentaram maior concentração do INF- $\gamma$  que as células estimuladas do subgrupo Jovens-alta ACR ( $p\text{-GV} = 0,003$ ) (**Figura 26A**).

O delta percentual entre as PBMCs estimuladas (LPS ou PMA+ionomicina) e não estimuladas foi calculado para confirmar se a magnitude de alteração na liberação das citocinas foi similar entre os subgrupos (**Figura 25 e 26**). Houve efeito principal de grupo entre Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR na magnitude de alteração das concentrações de TNF- $\alpha$  após estímulo com LPS nas PBMCs [**Wald (2) = 6,285;  $p = 0,043$ ; Wald (2) = 7,630;  $p\text{GV} = 0,022$** ], embora não detectado nas múltiplas comparações ( $p > 0,127$ ;  $p\text{-GV} > 0,103$ ) (**Figura 25B**). Por outro lado, não houve diferenças na magnitude de alteração das concentrações de IL-6 e IL-10 após o mesmo estímulo ([**IL-6: Wald (2) = 1,019;  $p = 0,601$ ; Wald (2) = 4,624;  $p\text{GV} = 0,099$** ] e [**IL-10: Wald (2) = 0,560;  $p = 0,756$ ; Wald (2) = 0,376;  $p\text{GV} = 0,829$** ]) (**Figura 25D e F**). Os subgrupos também não diferiram na magnitude da liberação do INF- $\gamma$  e IL-10 após estímulo com PMA+ionomicina nas PBMCs ([**INF- $\gamma$ : Wald (2) = 2,472;  $p = 0,291$ ; Wald (2) = 3,703;  $p\text{GV} = 0,157$** ] e [**IL-10: Wald (2) = 2,257;  $p = 0,323$ ; Wald (2) = 5,393;  $p\text{GV} = 0,067$** ]) (**Figura 26B e D, respectivamente**). As semelhanças entre os subgrupos na liberação de IL-6 e TNF- $\alpha$  permaneceram após ensaio do sangue total estimulado com LPS ([**IL-6: Wald (2) = 0,936;  $p = 0,626$ ; Wald (2) = 0,884;  $p\text{GV} = 0,643$** ] e [**TNF- $\alpha$ : Wald (2) = 2,723;  $p = 0,256$ ; Wald (2) = 3,838;  $p\text{GV} = 0,147$** ]) (**Figura 27**).

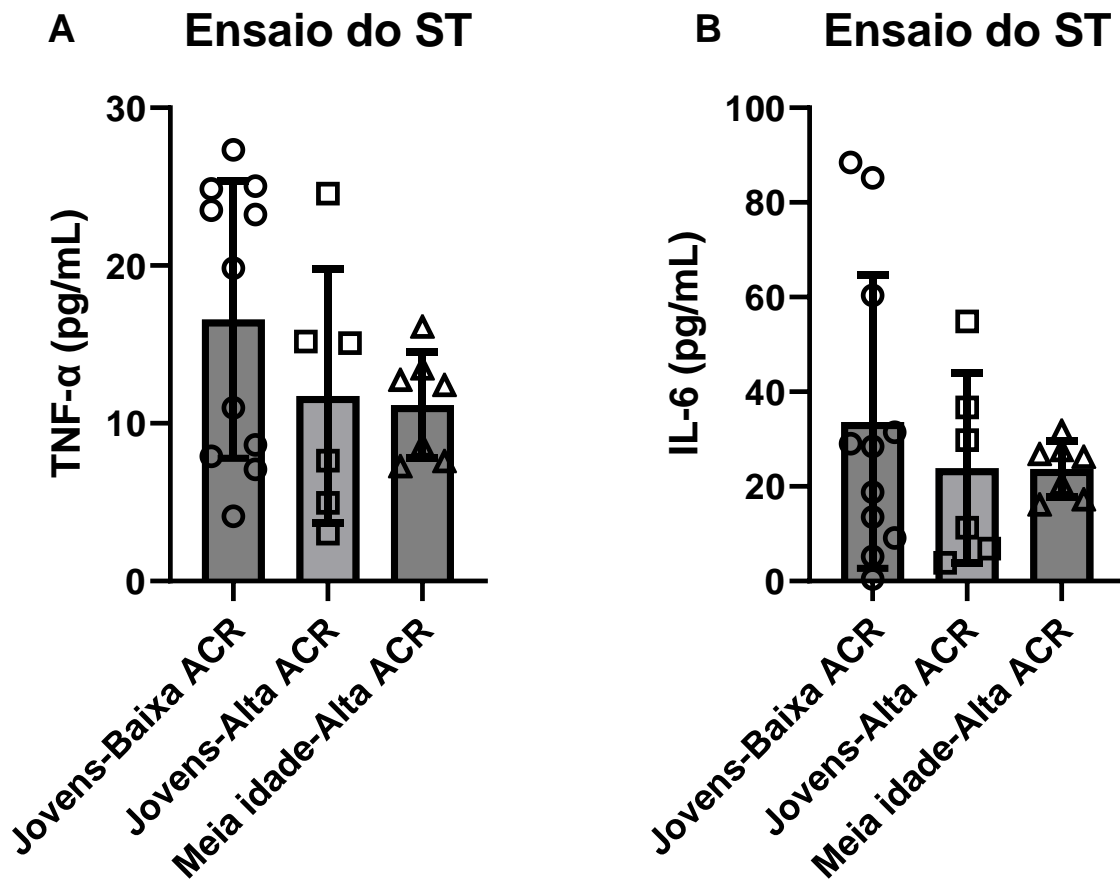
Em conjunto, embora indivíduos com baixa ACR apresentaram maior perfil inflamatório sistêmico, essas características não foram identificadas nos experimentos com as células imunológicas em conjunto, embora o subgrupo Meia idade-Alta ACR apresentou distinta resposta de linfócitos incubados com monócitos.



**Figura 25.** PBMCs estimuladas com LPS por 24 horas. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após incubação e apresentadas integralmente ou relativas de acordo com os subgrupos experimentais.  $p\text{-GV}$  = Análises ajustadas pela gordura visceral.



**Figura 26.** PBMCs estimuladas com PMA+ionomicina por 24 horas. As concentrações do IFN- $\gamma$  e IL-10 foram analisadas do sobrenadante de cultura após incubação e apresentadas integralmente ou relativas de acordo com os subgrupos experimentais.  $p-GV$  = Análises ajustadas pela gordura visceral.

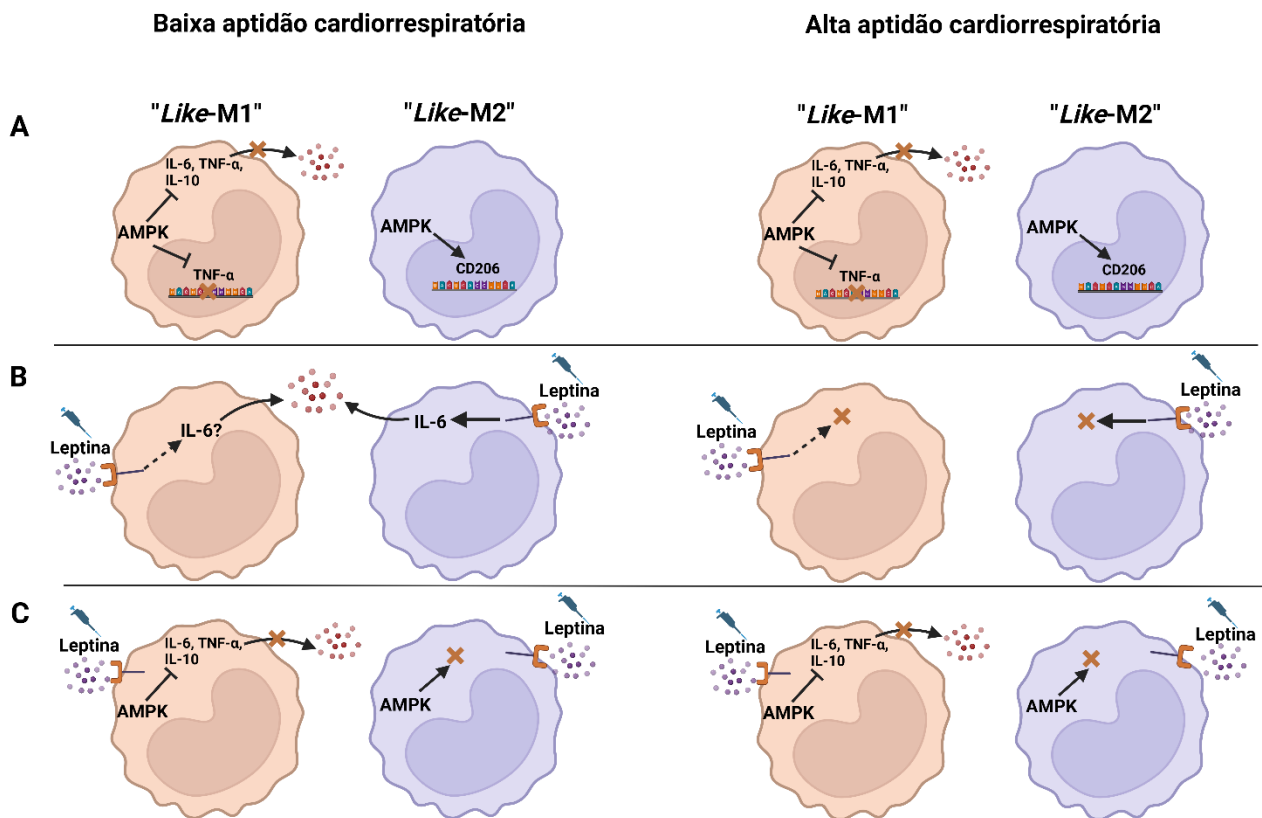


**Figura 27.** Ensaio do sangue total estimulado LPS por 6 horas. As concentrações do TNF- $\alpha$ , IL-6 foram analisadas do sobrenadante após incubação e apresentadas de acordo com os subgrupos experimentais. Os valores apresentados são referentes exclusivamente à condição estimulada com LPS, uma vez que as concentrações da condição sem estímulo não foram detectadas.

## DISCUSSÃO

A presente Tese de doutorado exhibe dados inéditos, com potencial avanço na fronteira do conhecimento da área da fisiologia do exercício. Rejeitando a hipótese nula, este estudo demonstrou que indivíduos com baixa ACR apresentam fenótipo mais pró-inflamatório dos monócitos polarizados na ausência ou presença da leptina. Por outro lado, confirmando a hipótese nula, a ativação da AMPK engrenou o fenótipo anti-inflamatório, independentemente do nível da ACR e presença da leptina,

especialmente nos monócitos estimulados para o fenótipo “like-M1” (**Figura 28**). Esses resultados fornecem novas evidências sobre a função da AMPK na polarização dos monócitos de acordo com o *status* da ACR/condicionamento físico, sugerindo a necessidade do ambiente pró-inflamatório prévio para função anti-inflamatória desse sensor energético durante a polarização dos monócitos.



**Figura 28.** Principais achados. A = Ativação da AMPK diminui a polarização para o fenótipo pró-inflamatório de monócitos “like-M1”, independentemente do *status* da aptidão cardiorrespiratória. B = Leptina estimula maior liberação de IL-6, exclusivamente durante a polarização dos monócitos de indivíduos com baixa aptidão cardiorrespiratória. C = Ação anti-inflamatória da AMPK permanece, mesmo na presença da leptina. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

Foi encontrado aumento significativo na secreção da IL-6 em monócitos “like-M1” de indivíduos jovens com baixa ACR quando comparado com aqueles com alta ACR, especialmente os mais jovens. Essa diferença é consistente com estudos anteriores que relataram maior secreção de citocinas inflamatórias em macrófagos de indivíduos com baixo condicionamento físico/alto percentual de gordura, o que pode contribuir para quadros inflamatórios crônicos (Bishop et al., 2023;

Voskoboynik et al., 2024). Vale ressaltar que os monócitos “like-M1” do subgrupo Meia Idade-Alta ACR apresentaram semelhante secreção da IL-6 que o subgrupo Jovens-Alta ACR, embora apenas uma diferença marginal que o subgrupo Jovens-Baixa ACR. Esses resultados sugerem que o avanço da idade não impactou de maneira determinante na modulação da ACR na secreção de citocinas inflamatórias dos monócitos polarizados, entretanto, mais pesquisas são necessárias com indivíduos de idade mais avançada e idosos ou com experimentos mais aprofundados na função/fenótipo celular.

O presente estudo também destaca maior expressão de genes relacionados ao metabolismo e inflamação, como AMPK, hexoquinase e citrato sintase, enquanto foi observada tendência para maior expressão do TNF- $\alpha$  e STAT-3 de monócitos “like-M2” dos indivíduos com baixa-ACR. A maior expressão gênica da AMPK em monócitos de indivíduos jovens com baixa-ACR, comparado com seus pares com alta ACR, já foi observada em estudos anteriores do laboratório, no qual monócitos (separados pelo método de densidade de gradiente) estimulados com rosiglitazona (agonista do PPAR- $\gamma$ ) exibiram o mesmo perfil (Antunes et al., 2020-1; Antunes et al., 2020-2). Possíveis mecanismos relacionados às regulações pós transcricionais devem ser considerados (Sukumaran et al., 2020) e evidenciam a necessidade de pesquisas avaliando a expressão proteica e estado de fosforilação da AMPK em monócitos de indivíduos com diferentes *status* da ACR.

É atraente sugerir que a maior expressão gênica das enzimas citrato sintase e hexoquinase pode ser um indício de desregulação no metabolismo dos monócitos “like-M2” dos indivíduos com baixa-ACR, devido uma possível deficiência a nível proteico. A hexoquinase contribui para sustentar o fluxo glicolítico e a citrato sintase favorece o aumento da síntese de citrato e engrena o ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (Ryan & O'Neill, 2020). Uma vez que a função reparadora dos monócitos “like-M2” é dependente da ativação dessas vias metabólicas (Van den Bossche et al., 2017), esses dados podem estar relacionados com a menor capacidade fagocítica e de imunodepressiva de macrófagos de indivíduos ou animais com baixa ACR/sedentários (Sugiura et al., 2001; Martín-Cordero et al., 2019; Walton et al., 2019; Gálvez et al., 2020). Contrariamente, a maior expressão gênica da hexoquinase e

citrato sintase, acompanhada com a tradução em proteínas (embora não analisada neste estudo), também pode estar relacionada à maior disponibilidade de esqueletos carbônicos para a biossíntese de espécies reativas de oxigênio e nucleotídeos (via glicólise/pentose fosfato) e de intermediários lipídicos e inflamatórios (via direcionamento do citrato para o ambiente extra mitocondrial), respectivamente (Kelly & O'Neill, 2015). Essas alterações se acoplarão a tendência para maior expressão gênica do TNF- $\alpha$  em monócitos “like-M2” encontrada no presente estudo. Em conjunto, análises a nível proteico/atividade enzimática e observações aprofundadas da função dos monócitos “like-M2” (por exemplo, ensaios de fagocitose ou potencial angiogênico) deverão ser exploradas futuramente para confirmação das hipóteses citadas.

É importante salientar que as diferenças fenotípicas em monócitos “like-M1” foram detectadas pela análise das citocinas secretadas, enquanto em monócitos “like-M2” pela análise da expressão gênica. A resposta frente o estímulo com LPS/INF- $\gamma$  geralmente apresenta cinética diferente quando comparada com estímulos anti-inflamatórios, como a IL-4 e IL-10 (Purcu et al., 2022). Portanto, a aparente dissociação entre secreção das citocinas e expressão gênica entre monócitos “like-M1” e “like-M2” pode estar relacionada ao tempo de coleta do sobrenadante e células. Adicionalmente, devido às limitações do poder amostral, não foi possível analisar o impacto da idade, através das subanálises com os subgrupos Jovens-Baixa ACR, Jovens-Alta ACR e Meia idade-Alta ACR, sobre a expressão gênica dos monócitos polarizados, o que garante mais pesquisas futuras se aprofundando nesse quesito.

Os resultados deste estudo também demonstraram que a ativação da AMPK reduziu a expressão gênica do TNF- $\alpha$ , além da secreção da IL-6, IL-10 e marginalmente do TNF- $\alpha$ , durante a polarização dos monócitos exclusivamente para o fenótipo “like-M1”, independente do *status* da ACR e da idade entre os indivíduos com maior ACR. Esses resultados corroboram com os achados da AMPK induzindo polarização de monócitos/macrófagos para fenótipos anti-inflamatórios em condições pró-inflamatórias, geradas pelo estímulo com LPS, IFN- $\gamma$  e PMA (Sag et al., 2008; Meares et al., 2013;

Vasamsetti et al., 2015; Bone et al., 2017), lesão muscular (Mounier et al., 2013) e dieta rica em gordura (Xiong et al., 2018; Cai et al., 2022). Os efeitos anti-inflamatórios também são adquiridos quando a AMPK é ativada em condições basais ou livres de estímulos/estressores pró-inflamatórios (Sag et al., 2008; Mounier et al., 2013). Assim, parece existir menor responsividade aos efeitos anti-inflamatórios da ativação da AMPK na condição enviesada para o ambiente/fenótipo anti-inflamatório, como na presença da IL-10. Vale ressaltar que o presente estudo utilizou estímulos pró-inflamatórios (LPS+INF- $\gamma$ ) e anti-inflamatório (IL-10), que potencialmente reduzem e aumentam a atividade da AMPK, respectivamente (Zhu et al., 2015; Ip et al., 2017; Bone et al., 2017). Portanto, é provável que a ativação da AMPK durante a polarização para o fenótipo *like-M1* esteja contrarregulando as vias de sinalização responsáveis pela expressão/secreção das citocinas pró-inflamatórias, e que, concomitantemente, inibem a própria AMPK (por exemplo, NF- $\kappa$ B) (Sag et al., 2008; Carroll et al., 2013). Por outro lado, a ativação da AMPK parece não exercer relevante efeito aditivo da ativação previamente estimulada pela IL-10. Esses dados são sustentados pelo singelo aumento na expressão do CD206 após polarização dos monócitos para o fenótipo “*like-M2*”. Futuros estudos devem se aprofundar nesses mecanismos e incluir outros estímulos de polarização anti-inflamatórios, como a IL-4, uma vez que a ativação da AMPK associada a IL-4 reduziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias estimuladas com LPS (Namgaladze et al., 2015).

Embora a ação anti-inflamatória da AMPK tenha exibido resposta similar durante a polarização dos monócitos para o fenótipo “*like-M1*”, os indivíduos com diferentes *status* de ACR podem se apropriar diferencialmente desse efeito. Sabe-se que a baixa ACR, especialmente acompanhada ao acúmulo de gordura visceral e/ou inatividade física, é geralmente associada com quadros inflamatórios não resolvidos (Lavie et al., 2011; Wedell-Neergaard et al., 2018), no qual foi parcialmente detectado no presente estudo (maiores concentrações séricas da leptina e insulina, maior HOMA-IR e menor razão adiponectina/leptina e adiponectina/tecido adiposo). Nesse contexto, a ativação da AMPK seria crucial para reduzir a resposta inflamatória, especialmente a redução da produção e liberação de

citocinas por monócitos/macrófagos pró-inflamatórios. Por outro lado, as sessões de exercício físico praticadas por indivíduos com alta ACR frequentemente promovem quadro inflamatório transitório a nível muscular (Peake et al., 2017). Tem sido demonstrado que animais nocautes para AMPK exibem prejuízos na polarização de macrófagos pró-inflamatórios (“like-M1”) para os macrófagos de reparo tecidual (“like-M2”) após lesão muscular induzida, prejudicando a regeneração muscular (Mounier et al., 2013; Caratti et al., 2023). Portanto, a ativação da AMPK em macrófagos no músculo esquelético, ou mesmo em outros tecidos ativos como o adiposo após as sessões de exercício físico intensas/exaustivas (Rosa Neto et al., 2009), poderia contribuir para o reestabelecimento da homeostase tecidual após inflamação transiente.

Este é o primeiro estudo que analisa a sensibilidade à ação da leptina na polarização dos monócitos, de acordo com o *status* do condicionamento físico. Como revisado anteriormente, a leptina geralmente estimula o fenótipo pró-inflamatório de monócitos/macrófagos (Monteiro et al., 2019). A sinalização excessiva desse hormônio a nível periférico, ou mesmo a resistência à sinalização no sistema nervoso central, é relacionada com quadros inflamatórios não resolvidos (Pérez-Pérez et al., 2020; Monteiro et al., 2022). Por outro lado, um dos efeitos anti-inflamatórios da prática regular de exercício físico é a redução das concentrações de leptina associada a perda de gordura corporal (Fedewa et al., 2018), que também pode ocorrer independente das alterações nos estoques de gordura (Inoue et al., 2018; Caldeira et al., 2018). Nesse contexto, os resultados da presente pesquisa sugerem regulação adicional da prática regular de exercício físico (maior ACR) através da ausência do aumento da secreção de citocinas estimulada pela leptina, exclusivamente após polarização dos monócitos dos indivíduos com alta ACR quando comparado com seus pares com baixa ACR. Vale ressaltar que a ação diferencial da leptina foi detectada pela singela superioridade na secreção da IL-6, acompanhada por uma correlação positiva entre a concentração de leptina e a liberação da IL-6, apenas nos monócitos polarizados de indivíduos com baixa ACR. Esses achados evidenciam a necessidade de aprofundamento na análise do fenótipo dos monócitos polarizados e vias de sinalização da leptina, bem

como abrem horizontes para pesquisas avaliando a responsividade à ação da leptina em células imunológicas, de acordo com o *status* da ACR e outras características relacionadas com a prática regular de exercício físico.

Ademais, a ativação da AMPK associada a estimulação da leptina diminuiu a liberação da IL6, IL-10 e TNF- $\alpha$  em monócitos polarizados para o fenótipo “like-M1”, independentemente do *status* da ACR. Os resultados estão de acordo com a ação anti-inflamatória da AMPK anteriormente demonstrada no ambiente pró-inflamatório, sugerindo que a presença da leptina pode não interferir na sua função.

O fenótipo inflamatório dos monócitos polarizados de indivíduos com baixa ACR foi acompanhado por alterações metabólicas e inflamatórias sistêmicas. Indivíduos com baixa ACR apresentaram maior percentual de monócitos clássicos, associado a maior concentração de leptina e insulina, superior razão leptina/gordura total e HOMA-IR, e menor razão adiponectina/leptina e adiponectina/gordura total. Esses dados indicam a presença de distúrbio metabólico no tecido adiposo, o que é corroborado pelo maior estoque de gordura corporal nesses indivíduos. Em detalhes, é provável que a inflamação local no tecido adiposo hipertrofiado, especialmente o depósito de tecido adiposo visceral dos indivíduos com baixa ACR, seja responsável pela redução na síntese da adiponectina (Ring-Dimitriou et al., 2006), embora não detectada diretamente no sangue periférico, e esteja relacionada com o início do quadro de resistência a ação da insulina (maior HOMA-IR e concentração de insulina) (Shimobayashi et al., 2018). Sabe-se que a leptina e outros hormônios/citocinas estimulam a mielopoiese (Claycombe et al., 2008), explicando parcialmente o maior percentual de monócitos clássicos acompanhado pela maior concentração desse hormônio. Por sua vez, os monócitos clássicos expostos ao ambiente pró-inflamatório na circulação ou tecidos periféricos (nesse caso, o tecido adiposo), exibem características para o fenótipos pró-inflamatórios, como demonstrado no presente estudo e em outros modelos experimentais de obesidade, quando na ausência do treinamento físico/inatividade física (Kawanishi et al., 2013; Baek et al., 2020).

Vale ressaltar que o *milieu* inflamatório permaneceu após os ajustes pela gordura visceral, fortalecendo observações anteriores de que a ausência de movimento por si, como o alto comportamento sedentário, inatividade física ou o não engajamento em exercícios físicos regulares, no qual direcionam para a menor ACR/condicionamento físico, é determinante para engrenar adaptações indesejadas, como distúrbios metabólicos e inflamatórios (Dorneles et al., 2019; Burini et al., 2020; Burns et al., 2021).

Adicionalmente, o subgrupo Jovens-Alta ACR apresentou maior percentual de células NK CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> e menor colesterol total sérico. Estudos anteriores apontam maior percentual de células NK CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> acompanhado por infecções virais crônicas e reativação viral (Cocker et al., 2023). A prática de exercício físico exaustivo/volumoso, dentre outras situações estressoras, está relacionada com reativações de vírus latentes, como o CMV, HSV e o vírus Epstein-Barr (Gleeson et al., 2002; Simpson et al., 2016; Simpson et al., 2020). Embora os subgrupos experimentais do presente estudo não diferiram na soropositividade para o CMV e HSV 1 e 2, não se pode destacar possíveis reativações virais ou soropositividade para outros vírus não analisados. Portanto, se o maior percentual de células NK CD56<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> é relacionado com a maior reativação viral ou infecções crônicas no subgrupo Jovens-Alta ACR, e se está relacionado com a prática de exercício físicos intensos, deve ser alvo de futuros estudos.

Por outro lado, a menor concentração do colesterol no subgrupo Jovens-alta ACR parece não ser explicada pelo comportamento alimentar, uma vez que a ingestão de micros e macros nutrientes entre os grupos, especialmente entre os grupos com alta ACR, foi similar. Entretanto, o ajuste pela gordura visceral tornou as diferenças na concentração de colesterol entre os grupos marginais, sugerindo que o aumento dos estoques gordura visceral seja um dos fatores responsáveis/relacionados (Okazaki et al., 2005).

Por fim, as PBMCs ou todas as células imunológicas do sangue (ensaio do sangue total) dos grupos experimentais responderam de maneira similar após o desafio com LPS. Embora a literatura

seja escassa quanto ao impacto da ACR na síntese de citocinas inflamatórias estimulada pelo LPS no ensaio do sangue total e cultura das PBMCs, diferentes estudos analisaram o impacto do treinamento aeróbio, com aumento da ACR, nesse mesmo desfecho (Sloan et al., 2007; Robinson et al., 2015; Sloan et al., 2018; Gerosa-Neto et al., 2020). Por exemplo, não foi observada diferenças após treinamento aeróbio, de intensidade moderada (65% da velocidade referente ao  $VO_{2\text{pico}}$  ou frequência cardíaca máxima) ou alta intensidade (100 e 95 % da velocidade referente ao  $VO_{2\text{pico}}$  e frequência cardíaca máxima, respectivamente), na síntese do TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6 no ensaio do sangue total estimulado com LPS (Robinson et al., 2015; Gerosa-Neto et al., 2020), embora indivíduos treinados apresentaram maior secreção da IL-10 imediatamente após a sessão aguda ao final do período de treinamento físico (Gerosa-Neto et al., 2020). Por outro lado, houve maior liberação da IL-6 e TNF- $\alpha$  após treinamento aeróbio com intensidade moderada (Sloan et al., 2018) ou supressão da secreção do TNF- $\alpha$  após o treinamento aeróbio de alta intensidade (Sloan et al., 2007) no sangue estimulado com LPS.

Interessantemente, a infusão de LPS em indivíduos com alta e baixa ACR ( $VO_{2\text{máximo}} > 55$  e  $< 45$  mL.kg.min<sup>-1</sup>, respectivamente) reduziu a expressão gênica do TNF- $\alpha$  em PBMCs apenas do grupo com baixa ACR, com nenhuma diferença para a expressão da IL-6 (Olesen et al., 2015). O mesmo estudo demonstrou que a expressão do TNF- $\alpha$  basal nas PBMCs foi 70% menor no grupo com alta ACR e que a resposta inflamatória no tecido adiposo e muscular foi distinta entre os grupos (Olesen et al., 2015). Portanto, o tipo de protocolo utilizado (infusão vs cultura celular), momento da análise (repouso ou após sessão de exercício), intensidade em que os voluntários praticam exercício ou mesmo o tempo de incubação e concentração do LPS, dificultam as comparações entre os estudos e podem ser responsáveis pelos diferentes resultados. É importante mencionar que os experimentos utilizados no presente estudo contêm outras populações de células imunológicas responsivas ao LPS que podem mascarar/diluir a resposta derivada dos monócitos clássicos. Outras subpopulações de monócitos e um pequeno percentual de células dendríticas são encontradas na cultura das PBMCs, enquanto o sangue total contém as mesmas populações citadas com adição dos granulócitos e outras células imunes

derivadas da medula óssea (Grievink et al., 2016; Sender et al., 2023). Assim, essa limitação pode explicar o porquê os experimentos “globais” *in vitro* não se acoplaram ao fenótipo observado dos monócitos clássicos polarizados, como a maior liberação da IL-6 em indivíduos com baixa ACR.

Por outro lado, as PBMCs do subgrupo Meia Idade-Alta ACR secretaram elevada quantidade de IL-10 na condição não estimulada e mais INF- $\gamma$  após estímulo com PMA+ionomicina. Tem sido sugerido que o treinamento ao longo da vida propicia adaptações moleculares e numéricas nas subpopulações de linfócitos, como o aumento da atividade citotóxica/efetora quando desafiadas (por exemplo, maior secreção de granzimas, perforinas e INF- $\gamma$ ) e aumento das subpopulações de linfócitos produtores de IL-10 (Padilha et al., 2021). A presente pesquisa não quantificou o número/percentual das subpopulações de linfócitos (por exemplo, células T reguladoras e Th1) na citometria de fluxo, tão pouco avaliou o histórico de treinamento dos voluntários, impossibilitando a ampliação desses resultados. Assim, uma vez que a IL-10 e INF- $\gamma$  secretados por linfócitos são conhecidos coordenadores fenotípicos dos monócitos/macrófagos (Cunha et al., 1992; Gazzinelli et al., 1992), mais pesquisas são necessárias avaliando o impacto da ACR, de acordo com a idade, na interação entre essas células.

#### *Forças e limitações do estudo*

O impacto da ACR sobre a polarização dos monócitos, de acordo com a idade, foi analisado em subanálises com indivíduos jovens e com meia idade que apresentaram similar ACR, nível de atividade física, comportamento alimentar e não foram diagnosticados com doenças, evitando potenciais interferências dessas variáveis. Por outro lado, não foi possível realizar as mesmas subanálises nos experimentos avaliando a expressão gênica e a participação da leptina na polarização dos monócitos, devido limitações com o tamanho amostral. Os resultados deste estudo também não podem ser generalizados para indivíduos mais velhos (por exemplo, idosos), com ou sem doenças diagnosticadas, tão pouco inferir o efeito da idade livre da influência da ACR, no qual não foi o objetivo

da pesquisa. Assim, estudos futuros com a adição de um grupo com meia idade e baixa ACR são necessários.

É conhecido que mulheres exibem resposta inflamatória diferente de homens (Klein & Flanagan, 2016), portanto, a composição exclusivamente masculina da amostra evitou possíveis fatores de confusão relacionados às diferenças de sexo. Entretanto, é importante ressaltar a relevância de incluir mulheres e analisar o impacto das diferenças de sexo na resposta inflamatória, a fim de otimizar a aplicabilidade dos resultados, tanto para o avanço científico em relação às potenciais diferenças, quanto para a apropriação desse avanço pela comunidade feminina. Assim, os resultados não podem ser generalizados para o sexo feminino e futuros estudos serão necessários com essa população, levando em conta a adequada avaliação das diferentes fases do ciclo menstrual, no qual também são determinantes para a resposta inflamatória frente a prática de exercício físico (Thompson & Han 2019).

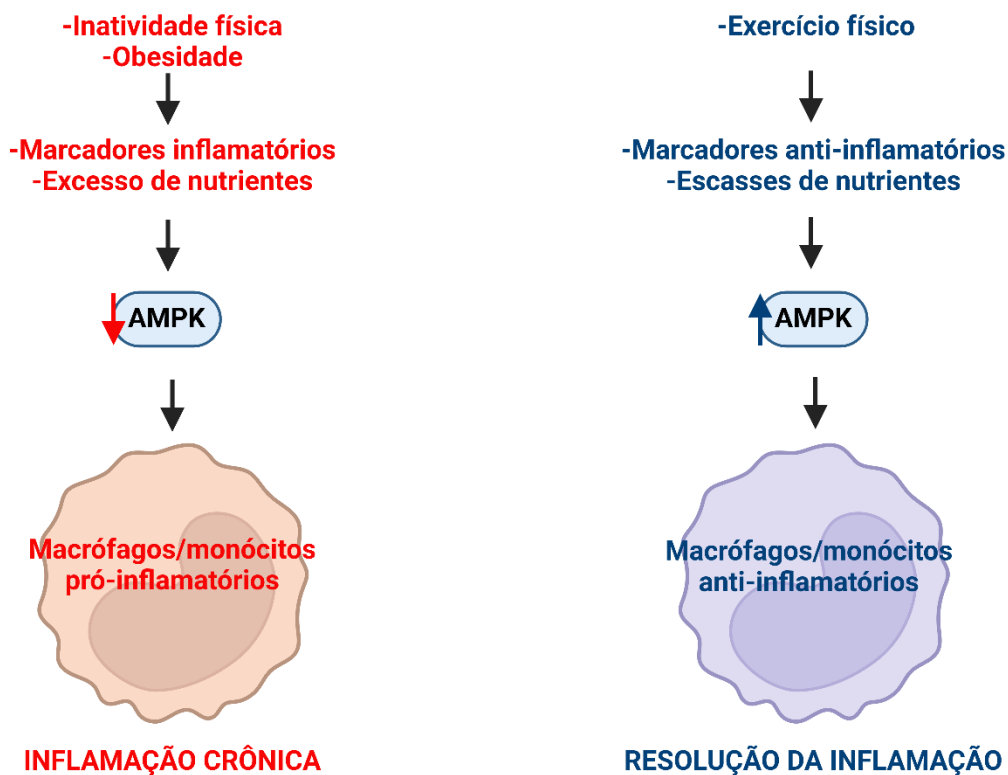
Por fim, a polarização dos monócitos foi realizada com monócitos clássicos, devido sua aparente maior plasticidade frente diferentes estímulos inflamatórios e potencial quimiotático para tecidos inflamados, quando comparado com as subpopulações de monócitos intermediária e não clássica (Geissmann et al., 2003; Devêvre et al., 2015; Vishnyakova et al., 2021). Assim, estudos adicionais devem ser realizados com outras subpopulações de monócitos, uma vez que apresentam comportamento/função próprio.

## CONCLUSÃO

Neste estudo foi explorado o impacto da ativação da AMPK e presença da leptina sobre a polarização dos monócitos de indivíduos com diferentes níveis de ACR. Como conclusão, a leptina parece atuar diferencialmente na indução do estado de polarização dos monócitos de indivíduos com diferente *status* da ACR. Por outro lado, a ativação da AMPK induz fenótipo anti-inflamatório durante polarização para o fenótipo “like-M1”, independentemente do nível da ACR, idade entre os participantes com alta ACR e presença da leptina. Portanto, indivíduos com diferente *status* da ACR

parecem se beneficiar similarmente dos efeitos anti-inflamatórios da AMPK na polarização dos monócitos. Esses achados podem ser interessantes no contexto de condições inflamatórias acompanhadas pelo aumento exacerbado de monócitos/macrófagos pró-inflamatórios, como na inflamação crônica acompanhada pelo aumento do tecido adiposo/concentrações da leptina, ou na resolução da inflamação muscular após sessões intensas/exaustivas de exercício físico (**Figura 29**).

### HIPÓTESE

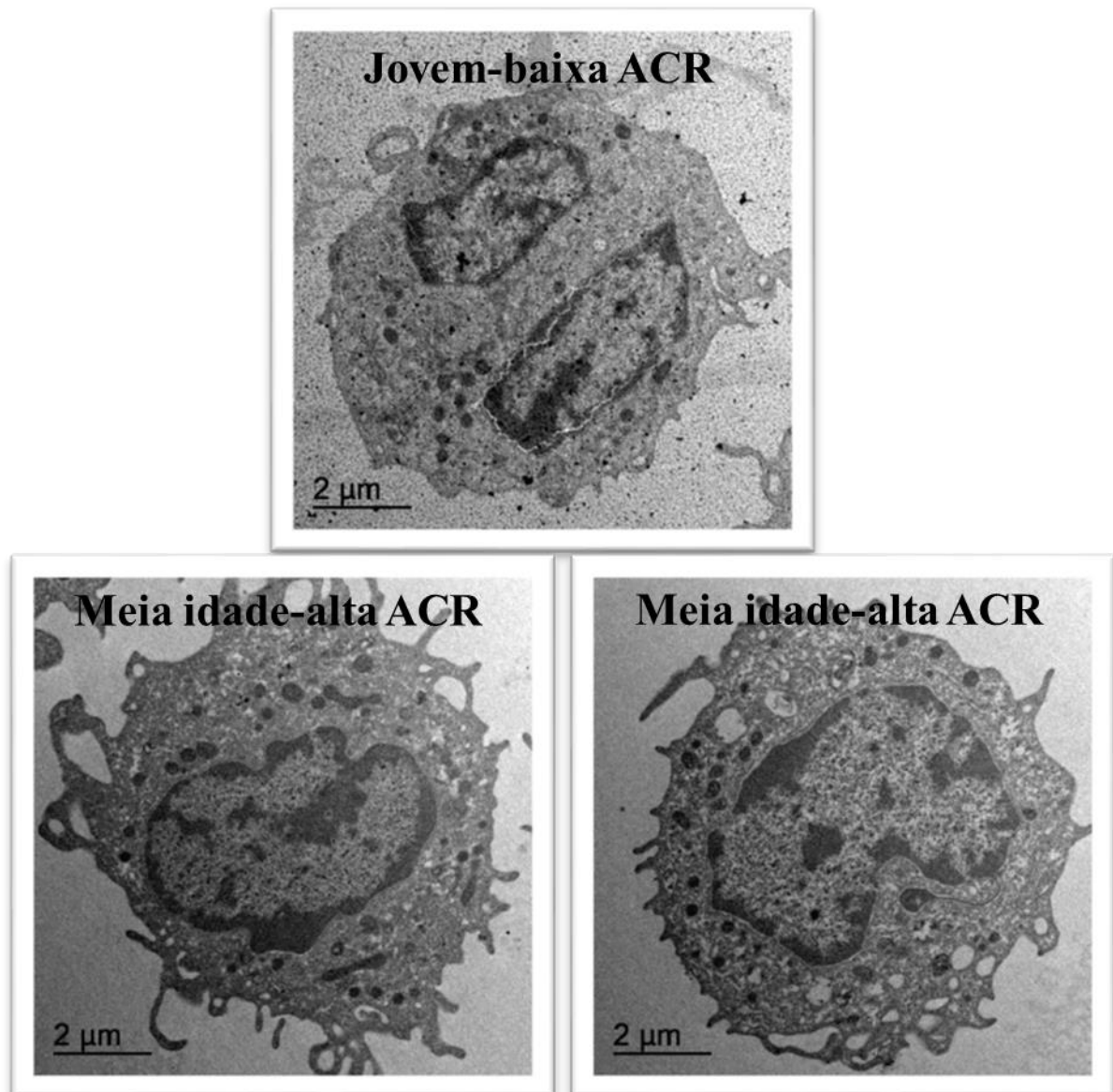


**Figura 29.** Hipótese para a aplicação dos resultados. Criado pelo autor em <https://BioRender.com>.

### RESULTADOS EM ANDAMENTO

Para compreender melhor o perfil inflamatório sistêmico, bem como das PBMCs e dos monócitos, os seguintes experimentos estão sendo realizados: 1) Análise da respiração mitocondrial das PBMCs, devido a relação dessa variável com a resposta inflamatória das células imunológicas (Hodgman et al., 2023); 2) microscopia eletrônica de transmissão dos monócitos clássicos (**ver**

imagens gerais preliminares, **Figura 30**), especialmente das mitocôndrias e fluxo autofágico, características essas relacionadas com a funcionalidade dos monócitos (Germic et al., 2019); e 3) análise da concentração sistêmica do LPS e a quantificação da ingestão de alimentos ultraprocessados, com o objetivo de explorar o eixo de desregulação intestinal e perfil inflamatório sistêmico (Maki et al., 2014).



**Figura 30.** Imagens dos monócitos clássicos realizadas através da microscopia eletrônica de transmissão, sem identificação das mitocondriais e fluxo autofágico.

## REFERÊNCIAS

1. AMANO, S. U. et al. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 162-171, 2014.
2. ANTUNES, B. M. et al. Exercise intensity and physical fitness modulate lipoproteins profile during acute aerobic exercise session. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 4160, 2020.
3. ANTUNES, B. M. et al. Physical fitness status modulates the inflammatory proteins in peripheral blood and circulating monocytes: role of PPAR-gamma. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 14094, 2020.
4. AROOR, A. R. et al. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. **Metabolism**, v. 62, n. 11, p. 1543-1552, 2013.
5. ASTERHOLM, I. W. et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. **Cell Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 103-118, 2014.
6. AVRAHAM, R. et al. Pathogen cell-to-cell variability drives heterogeneity in host immune responses. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1309-1321, 2015.
7. BAEK, K. W. et al. Effects of lifelong spontaneous exercise on the M1/M2 macrophage polarization ratio and gene expression in adipose tissue of super-aged mice. **Experimental Gerontology**, v. 141, p. 111091, 2020.
8. BARRY, J. C. et al. Short-term exercise training reduces anti-inflammatory action of interleukin-10 in adults with obesity. **Cytokine**, v. 111, p. 460-469, 2018. doi: 10.1016/j.cyto.2018.05.035.
9. BATATINHA, H. et al. Human lymphocytes mobilized with exercise have an anti-tumor transcriptomic profile and exert enhanced graft-versus-leukemia effects in xenogeneic mice. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1067369, 2023.

10. BISHOP, N. C. et al. Inactivity and obesity: consequences for macrophage-mediated inflammation and the development of cardiometabolic disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 82, n. 1, p. 13-21, 2023.
11. BONE, N. B. et al. Frontline Science: D1 dopaminergic receptor signaling activates the AMPK-bioenergetic pathway in macrophages and alveolar epithelial cells and reduces endotoxin-induced ALI. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 101, n. 2, p. 357-365, 2017.
12. BOOTH, F. W. et al. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1143, 2012.
13. BORIES, G. et al. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 9, n. 3, p. 189-195, 2012.
14. BOROUMAND, P. et al. Bone marrow adipocytes drive the development of tissue invasive Ly6Chigh monocytes during obesity. **Elife**, v. 11, p. e65553, 2022.
15. BOYETTE, L. B. et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0176460, 2017.
16. BURINI, R. C. et al. Inflammation, physical activity, and chronic disease: an evolutionary perspective. **Sports Medicine and Health Science**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2020.
17. BURNS, A. M. et al. Immobilisation induces sizeable and sustained reductions in forearm glucose uptake in just 24 h but does not change lipid uptake in healthy men. **The Journal of Physiology**, v. 599, n. 8, p. 2197-2210, 2021.
18. CABRAL-SANTOS, Carolina et al. Inflammatory cytokines and BDNF response to high-intensity intermittent exercise: effect the exercise volume. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 509, 2016.

19. CAI, H. et al. Moderate l-lactate administration suppresses adipose tissue macrophage M1 polarization to alleviate obesity-associated insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 4, 2022.
20. CALDEIRA, R. S. et al. Impact to short-term high intensity intermittent training on different storages of body fat, leptin and soluble leptin receptor levels in physically active non-obese men: A pilot investigation. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 28, p. 186-192, 2018.
21. CALDERIN, E. P. et al. Exercise-induced specialized proresolving mediators stimulate AMPK phosphorylation to promote mitochondrial respiration in macrophages. **Molecular Metabolism**, v. 66, p. 101637, 2022.
22. CAMELL, C. D. et al. Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing. **Nature**, v. 550, n. 7674, p. 119-123, 2017.
23. CARATTI, G. et al. Macrophagic AMPK $\alpha$ 1 orchestrates regenerative inflammation induced by glucocorticoids. **EMBO Reports**, v. 24, n. 2, p. e55363, 2023.
24. CARROLL, K. C. et al. AMPK $\alpha$ 1 deficiency amplifies proinflammatory myeloid APC activity and CD40 signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 6, p. 1113-1121, 2013.
25. CHAN, K. L. et al. Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK). **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 27, p. 16979-16988, 2015.
26. CHAWLA, A. et al. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 738-749, 2011.
27. CIFUENTES, M. et al. Low-grade chronic inflammation: A shared mechanism for chronic diseases. **Physiology**, v. 40, n. 1, p. 4-25, 2025.

28. ČÍŽKOVÁ, T. et al. Exercise training reduces inflammation of adipose tissue in the elderly: cross-sectional and randomized interventional trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 12, p. e4510-e4526, 2020.
29. CLAYCOMBE, K. et al. A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 6, p. 2017-2021, 2008.
30. COCKER, A. T. et al. The CD56<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> NK cell subset in chronic infections. **Biochemical Society Transactions**, v. 51, n. 3, p. 1201-1212, 2023.
31. CRAIG, Cora L. et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 35, n. 8, p. 1381-1395, 2003.
32. CUNHA, F. D. Q. et al. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 182, n. 3, p. 1155-1159, 1992.
33. CUI, Y. et al. The role of AMPK in macrophage metabolism, function and polarisation. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, n. 1, p. 892, 2023.
34. CURI, R. et al. A past and present overview of macrophage metabolism and functional outcomes. **Clinical Science**, v. 131, n. 12, p. 1329-1342, 2017.
35. DAGDEVIREN, S. et al. IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 2, p. 701, 2016.
36. DAMASCENO, D. et al. Distribution of subsets of blood monocytic cells throughout life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 144, n. 1, p. 320-323, 2019.
37. DAVIES, M. G.; HAGEN, P. O. Systemic inflammatory response syndrome. **British Journal of Surgery**, v. 84, n. 7, p. 920-935, 1997.

38. DAVIES, N. A. et al. The contributions of oxidative stress, oxidised lipoproteins and AMPK towards exercise-associated PPAR $\gamma$  signalling within human monocytic cells. **Free Radical Research**, v. 49, n. 1, p. 45-56, 2015.
39. DEFINA, L. F. et al. Physical activity versus cardiorespiratory fitness: two (partly) distinct components of cardiovascular health?. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 57, n. 4, p. 324-329, 2015.
40. DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al. Adipose tissue inflammation in breast cancer survivors: effects of a 16-week combined aerobic and resistance exercise training intervention. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 168, p. 147-157, 2018.
41. DI VINCENZO, F. et al. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. **Internal and Emergency Medicine**, v. 19, n. 2, p. 275-293, 2024.
42. DIB, L. H. et al. Bone marrow leptin signaling mediates obesity-associated adipose tissue inflammation in male mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 40-46, 2014.
43. DORNELES, G. P. et al. Cardiorespiratory fitness modulates the proportions of monocytes and T helper subsets in lean and obese men. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 29, n. 11, p. 1755-1765, 2019.
44. ELFEKY, M. et al. Adiponectin inhibits LPS-induced HMGB1 release through an AMP kinase and heme oxygenase-1-dependent pathway in RAW 264 macrophage cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, n. 1, p. 5701959, 2016.
45. FEDEWA, M. V. et al. The effect of chronic exercise training on leptin: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Sports Medicine**, v. 48, p. 1437-1450, 2018.
46. FENG, X. et al. Metformin, macrophage dysfunction and atherosclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 682853, 2021.

47. FIELD, A. Discovering statistics using IBM SPSS statistics. 5. ed. [S.l.]: Sage, 2020.
48. FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 10, p. 576-590, 2018.
49. FRASCA, D. et al. Aging, obesity, and inflammatory age-related diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1745, 2017.
50. FULLER, K. N. et al. Effect of a single bout of aerobic exercise on high-fat meal-induced inflammation. **Metabolism**, v. 71, p. 144-152, 2017.
51. GALIC, S. et al. Hematopoietic AMPK  $\beta$ 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, p. 4903-4915, 2011.
52. GÁLVEZ, I. et al.  $\beta$ 2 Adrenergic regulation of the phagocytic and microbicide capacity of circulating monocytes: influence of obesity and exercise. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1438, 2020.
53. GAZZINELLI, R. T. et al. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$ -activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 6, p. 1792-1796, 1992.
54. GEISSMANN, F. et al. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, 2003.
55. GELONEZE, B. et al. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population: IR in the Brazilian metabolic syndrome study. **Diabetes research and clinical practice**, v. 72, n. 2, p. 219-220, 2006.
56. GERMIC, Nina et al. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 4, p. 715-727, 2019.

57. GEROSA-NETO, J. et al. High-and moderate-intensity training modify LPS-induced ex-vivo interleukin-10 production in obese men in response to an acute exercise bout. **Cytokine**, v. 136, p. 155249, 2020.
58. GLASS, C. K.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 635-645, 2012.
59. GLEESON, M. et al. Epstein-Barr virus reactivation and upper-respiratory illness in elite swimmers. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 34, n. 3, p. 411-417, 2002.
60. GRAFF, R. M. et al.  $\beta$ 2-Adrenergic receptor signaling mediates the preferential mobilization of differentiated subsets of CD8<sup>+</sup> T-cells, NK-cells and non-classical monocytes in response to acute exercise in humans. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 74, p. 143-153, 2018.
61. GRATAS-DELMARCHE, A. et al. Physical inactivity, insulin resistance, and the oxidative-inflammatory loop. **Free Radical Research**, v. 48, n. 1, p. 93-108, 2014.
62. GRIEVINK, H. W. et al. Comparison of three isolation techniques for human peripheral blood mononuclear cells: cell recovery and viability, population composition, and cell functionality. **Biopreservation and Biobanking**, v. 14, n. 5, p. 410-415, 2016.
63. HAMERS, A. A. et al. Human monocyte heterogeneity as revealed by high-dimensional mass cytometry. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 1, p. 25-36, 2019.
64. HARRIS, H. Chemotaxis of monocytes. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 34, n. 3, p. 276, 1953.
65. HEARPS, A. C. et al. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. **Aging Cell**, v. 11, n. 5, p. 867-875, 2012.

66. HERDY, A. H.; CAIXETA, A. Brazilian cardiorespiratory fitness classification based on maximum oxygen consumption. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, p. 389-395, 2016.
67. HIRANO, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. **International Immunology**, v. 33, n. 3, p. 127-148, 2021.
68. HODGMAN, Charles F. et al. A Scoping Review on the Effects of Physical Exercise and Fitness on Peripheral Leukocyte Energy Metabolism in Humans. **Exercise Immunology Review**, v. 29, 2023.
69. HONG, S. et al. Benefit of physical fitness against inflammation in obesity: role of beta adrenergic receptors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 39, p. 113-120, 2014.
70. HUANGFU, N. et al. RBM4 regulates M1 macrophages polarization through targeting STAT1-mediated glycolysis. **International Immunopharmacology**, v. 83, p. 106432, 2020.
71. INFANTINO, V. et al. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. **Biochemical Journal**, v. 438, n. 3, p. 433-436, 2011.
72. INOUE, D. S. et al. Reduced leptin level is independent of fat mass changes and hunger scores from high-intensity intermittent plus strength training. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 58, n. 7-8, p. 1045-1051, 2017.
73. IP, W. E. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513-519, 2017.
74. ISLAM, H. et al. Interpreting ‘anti-inflammatory’ cytokine responses to exercise: focus on interleukin-10. **The Journal of Physiology**, v. 599, n. 23, p. 5163-5177, 2021.

75. ISLAM, H. et al. Direct assessment of leukocyte signalling and cytokine secretion reveals exercise intensity-dependent reductions in anti-inflammatory cytokine action. **The Journal of Physiology**, 2024.
76. JACINTO, T. A. et al. Increased ROS production and DNA damage in monocytes are biomarkers of aging and atherosclerosis. **Biological Research**, v. 51, p. 1-13, 2018.
77. JAKUBZICK, C. V. et al. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 6, p. 349-362, 2017.
78. JHA, A. K. et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 419-430, 2015.
79. JUNKIN, M. et al. High-content quantification of single-cell immune dynamics. **Cell Reports**, v. 15, n. 2, p. 411-422, 2016.
80. KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, 2006.
81. KAPELLOS, T. S. et al. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2035, 2019.
82. KAMINSKY, L. A. et al. Cardiorespiratory fitness and cardiovascular disease-the past, present, and future. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 62, n. 2, p. 86-93, 2019.
83. KAWANISHI, N. et al. Exercise attenuates M1 macrophages and CD8+ T cells in the adipose tissue of obese mice. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 45, n. 9, p. 1684-1693, 2013.

84. KELLY, T. J. et al. GCN5-mediated transcriptional control of the metabolic coactivator PGC-1 $\beta$  through lysine acetylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 30, p. 19945-19952, 2009.
85. KELLY, B.; O'NEILL, L. A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. **Cell Research**, v. 25, n. 7, p. 771-784, 2015.
86. KIM, O. H. et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cells causes accumulation of bone marrow-derived macrophages in aged mice. **BMB Reports**, v. 50, n. 1, p. 43, 2017.
87. KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626-638, 2016.
88. KOCH, P. D. et al. A high content screen in macrophages identifies small molecule modulators of STING-IRF3 and NF $\kappa$ B signaling. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 4, p. 1066-1081, 2018.
89. KOKKINOS, P. et al. Physical inactivity and mortality risk. **Cardiology Research and Practice**, v. 2011, n. 1, p. 924945, 2011.
90. KOLAHDOUZI, S. et al. Exercise training prevents high-fat diet-induced adipose tissue remodeling by promoting capillary density and macrophage polarization. **Life Sciences**, v. 220, p. 32-43, 2019.
91. KRASNIEWSKI, L. K. et al. Single-cell analysis of skeletal muscle macrophages reveals age-associated functional subpopulations. **Elife**, v. 11, p. e77974, 2022.
92. KUBO, H. et al. Primary tumors limit metastasis formation through induction of IL15-mediated cross-talk between patrolling monocytes and NK cells. **Cancer Immunology Research**, v. 5, n. 9, p. 812-820, 2017.

93. LACHMANDAS, E. et al. Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 1-10, 2016.
94. LAKENS, D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. **Frontiers in Psychology**, v. 4, p. 863, 2013.
95. LANG, J. J. et al. Cardiorespiratory fitness is a strong and consistent predictor of morbidity and mortality among adults: an overview of meta-analyses representing over 20.9 million observations from 199 unique cohort studies. **British Journal of Sports Medicine**, v. 58, n. 10, p. 556-566, 2024.
96. LAVIE, C. J. et al. Impact of physical activity, cardiorespiratory fitness, and exercise training on markers of inflammation. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention**, v. 31, n. 3, p. 137-145, 2011.
97. LEE, M. J.; FRIED, S. K. Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1230-E1238, 2009.
98. LEE, I. M. et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **The Lancet**, v. 380, n. 9838, p. 219-229, 2012.
99. LEE, Y. J. et al. Stimulation of Alpha1-Adrenergic Receptor Ameliorates Cellular Functions of Multiorgans beyond Vasomotion through PPAR $\delta$ . **PPAR Research**, v. 2020, n. 1, p. 3785137, 2020.
100. LEE, J.; ZHANG, X. L. Physiological determinants of VO<sub>2</sub>max and the methods to evaluate it: A critical review. **Science & Sports**, v. 36, n. 4, p. 259-271, 2021.

101. LIEBERMAN, D. E. Is exercise really medicine? An evolutionary perspective. **Current Sports Medicine Reports**, v. 14, n. 4, p. 313-319, 2015.
102. LINEHAN, E. et al. Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. **Aging Cell**, v. 13, n. 4, p. 699-708, 2014.
103. LIU, P. S. et al.  $\alpha$ -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. **Nature Immunology**, v. 18, n. 9, p. 985-994, 2017.
104. LUO, W. et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 732-744, 2011.
105. LUO, L. et al. High-Intensity Interval Training Improves Physical Function, Prevents Muscle Loss, and Modulates Macrophage-Mediated Inflammation in Skeletal Muscle of Cerebral Ischemic Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, n. 1, p. 1849428, 2021.
106. MAKI, Katherine A.; SACK, Michael N.; HALL, Kevin D. Ultra-processed foods: increasing the risk of inflammation and immune dysregulation?. **Nature Reviews Immunology**, p. 1-2, 2024.
107. MARTÍN-CORDERO, L. et al.  $\beta$ 2 adrenergic regulation of the phagocytic and microbicide capacity of macrophages from obese and lean mice: Effects of exercise. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2721, 2019.
108. MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, 2014.
109. MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized Linear Models**. 2. ed. Routledge, 1989. <https://doi.org/10.1201/9780203753736>.
110. MEARES, G. P. et al. AMP-activated protein kinase restricts IFN- $\gamma$  signaling. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1, p. 372-380, 2013.

111. MEISER, J. et al. Pro-inflammatory macrophages sustain pyruvate oxidation through pyruvate dehydrogenase for the synthesis of itaconate and to enable cytokine expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 8, p. 3932-3946, 2016.
112. METCALF, T. U. et al. Human monocyte subsets are transcriptionally and functionally altered in aging in response to pattern recognition receptor agonists. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 4, p. 1405-1417, 2017.
113. MEYER, K. C. The role of immunity and inflammation in lung senescence and susceptibility to infection in the elderly. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 31, n. 5, p. 561-574, 2010.
114. MILLIKEN, L. A. et al. Effects of variations in regional composition on soft tissue measurements by dual-energy X-ray absorptiometry. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 20, n. 7, p. 677-682, 1996.
115. MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.
116. MOIR, H. et al. AMPK inactivation in mononuclear cells: a potential intracellular mechanism for exercise-induced immunosuppression. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 75-85, 2008.
117. MOIR, H. et al. Exercise-induced immunosuppression: roles of reactive oxygen species and 5'-AMP-activated protein kinase dephosphorylation within immune cells. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 5, p. 1284-1292, 2010.
118. MONTEIRO, L. et al. Leptin in the regulation of the immunometabolism of adipose tissue-macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 703-716, 2019.

119. MONTEIRO, L. D. B. et al. Leptin signaling suppression in macrophages improves immunometabolic outcomes in obesity. **Diabetes**, v. 71, n. 7, p. 1546-1561, 2022.
120. MOON, J. S. et al. mTORC1-induced HK1-dependent glycolysis regulates NLRP3 inflammasome activation. **Cell Reports**, v. 12, n. 1, p. 102-115, 2015.
121. MORRIS, J. N. et al. Coronary heart-disease and physical activity of work. **The Lancet**, v. 265, p. 1053-1057, 1953.
122. MOUNIER, R. et al. AMPK $\alpha$ 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 251-264, 2013.
123. MÜNZBERG, H. et al. History and future of leptin: Discovery, regulation and signaling. **Metabolism**, v. 156026, 2024.
124. NAMGALADZE, D. et al. AMP-activated protein kinase suppresses arachidonate 15-lipoxygenase expression in interleukin 4-polarized human macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 40, p. 24484-24494, 2015.
125. OKAZAKI, M. et al. Identification of unique lipoprotein subclasses for visceral obesity by component analysis of cholesterol profile in high-performance liquid chromatography. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 3, p. 578-584, 2005.
126. OLEAN-OLIVEIRA, Tiago et al. Central obesity is detrimental to anti-inflammatory, phenotype, and exhaustion markers in mononuclear cells-A cross-sectional study. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 58, p. 397-408, 2023.
127. OLESEN, J. et al. Impact of training status on LPS-induced acute inflammation in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 7, p. 818-829, 2015.

128. OLINGY, C. E. et al. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 309-322, 2019.
129. OLSEN, R. H. et al. Metabolic responses to reduced daily steps in healthy nonexercising men. **JAMA**, v. 299, n. 11, 2008.
130. ONG, S. M. et al. The pro-inflammatory phenotype of the human non-classical monocyte subset is attributed to senescence. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 3, p. 266, 2018.
131. OU, H. et al. Role of AMPK in atherosclerosis via autophagy regulation. **Science China Life Sciences**, v. 61, p. 1212-1221, 2018.
132. PADILHA, C. S. et al. Immunometabolic responses according to physical fitness status and lifelong exercise during aging: New roads for exercise immunology. **Ageing Research Reviews**, v. 68, p. 101341, 2021.
133. PAPAGIANNI, G. et al. The anti-inflammatory effects of aerobic exercise training in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Cytokine**, v. 164, p. 156157, 2023.
134. PARK, J. H. et al. Sedentary lifestyle: overview of updated evidence of potential health risks. **Korean Journal of Family Medicine**, v. 41, n. 6, p. 365, 2020.
135. PARK, M. D. et al. Macrophages in health and disease. **Cell**, v. 185, n. 23, p. 4259-4279, 2022.
136. PASCUAL, G. et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- $\gamma$ . **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 759-763, 2005.
137. PEAKE, J. M. et al. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. **Journal of Applied Physiology**, 2017.

138. PEDERSEN, B. K. The disease of physical inactivity—and the role of myokines in muscle–fat cross talk. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 23, p. 5559-5568, 2009.
139. PEREIRA, R. A.; SICHIERI, R. Métodos de avaliação do consumo de alimentos. In: KAC, G.; SICHIERI, R.; GIGANTE, D. P. (Org.). **Epidemiologia nutricional**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ/Atheneu, 2007. p. 181-200. Disponível em: <http://books.scielo.org>.
140. PÉREZ-PÉREZ, A. et al. Role of leptin in inflammation and vice versa. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5887, 2020.
141. PICÓ, C. et al. Leptin as a key regulator of the adipose organ. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 23, n. 1, p. 13-30, 2022.
142. PILLAI, P. S. et al. Mx1 reveals innate pathways to antiviral resistance and lethal influenza disease. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 463-466, 2016.
143. PIRZGALSKA, R. M. et al. Sympathetic neuron–associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine. **Nature Medicine**, v. 23, n. 11, p. 1309-1318, 2017.
144. PRIEUR, X. et al. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. **Diabetes**, v. 60, n. 3, p. 797-809, 2011.
145. QIN, F. et al. The effects of exercise on microRNA expression profiling in adipose tissue macrophages of mice. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1412621, 2024.
146. RAULIEN, N. et al. Fatty acid oxidation compensates for lipopolysaccharide-induced Warburg effect in glucose-deprived monocytes. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 609, 2017.

147. RING-DIMITRIOU, S. et al. The effect of physical activity and physical fitness on plasma adiponectin in adults with predisposition to metabolic syndrome. **European Journal of Applied Physiology**, v. 98, p. 472-481, 2006.
148. ROBINSON, E. et al. Short-term high-intensity interval and moderate-intensity continuous training reduce leukocyte TLR4 in inactive adults at elevated risk of type 2 diabetes. **Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 5, p. 508-516, 2015.
149. RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, H. et al. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, n. 1, p. 678159, 2013.
150. RUFFINO, J. S. et al. Moderate-intensity exercise alters markers of alternative activation in circulating monocytes in females: a putative role for PPAR $\gamma$ . **European Journal of Applied Physiology**, v. 116, p. 1671-1682, 2016.
151. ROSA NETO, J. C. et al. Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 106, p. 697-704, 2009.
152. RYAN, D. G.; O'NEILL, L. A. Krebs cycle reborn in macrophage immunometabolism. **Annual Review of Immunology**, v. 38, n. 1, p. 289-313, 2020.
153. SAARE, M. et al. Monocytes present age-related changes in phospholipid concentration and decreased energy metabolism. **Aging Cell**, v. 19, n. 4, p. e13127, 2020.
154. SADEGHI, H. M. et al. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. **Experimental Gerontology**, v. 34, n. 8, p. 959-970, 1999.
155. SAG, D. et al. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 12, p. 8633-8641, 2008.

156. SALTIN, B. et al. Response to exercise after bed rest and after training. **Circulation**, v. 38, p. VII1–78, 1968.
157. SANTOS-ALVAREZ, J.; GOBERNA, R.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 6-11, 1999.
158. SCHOBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L. A. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. **Anesthesia & Analgesia**, v. 126, n. 5, p. 1763-1768, 2018.
159. SENDER, R. et al. The total mass, number, and distribution of immune cells in the human body. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 44, p. e2308511120, 2023.
160. SERBINA, N. V. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59-70, 2003.
161. SEIDLER, S. et al. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. **BMC Immunology**, v. 11, p. 1-11, 2010.
162. SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Metabolic messengers: tumour necrosis factor. **Nature Metabolism**, v. 3, n. 10, p. 1302-1312, 2021.
163. SHALEK, A. K. et al. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. **Nature**, v. 498, n. 7453, p. 236-240, 2013.
164. SHAPIRO, H. et al. Adipose tissue foam cells are present in human obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 3, p. 1173-1181, 2013.
165. SHIMOBAYASHI, M. et al. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 4, p. 1538-1550, 2018.
166. SILVEIRA, L. S. et al. Macrophage polarization: implications on metabolic diseases and the role of exercise. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 26, n. 2, 2016.

167. SILVEIRA, L. S. et al. Exercise rescues the immune response fine-tuned impaired by peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  deletion in macrophages. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 4, p. 5241-5251, 2019.
168. SILVEIRA, L. S. et al. Macrophage immunophenotype but not anti-inflammatory profile is modulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) in exercised obese mice. **Exercise Immunology Review**, v. 26, p. 10-22, 2020.
169. SIMONS, P. J. et al. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor- $\alpha$ -and interleukin-1 $\beta$ -treated human preadipocytes are potent leptin producers. **Cytokine**, v. 32, n. 2, p. 94-103, 2005.
170. SIMOPOULOS, A. P. The Hippocratic concept of positive health in the 5th century BC and in the new millennium. In: **Nutrition and Fitness: Diet, Genes, Physical Activity and Health**. v. 89, p. 1-4. Karger Publishers, 2001.
171. SIMPSON, R. J. et al. Human cytomegalovirus infection and the immune response to exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 22, 2016.
172. SIMPSON, R. J. et al. Can exercise affect immune function to increase susceptibility to infection?. **Exercise Immunology Review**, v. 26, p. 8-22, 2020.
173. SLOAN, R. P. et al. Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 3, p. 1007-1011, 2007.
174. SLOAN, R. P. et al. Aerobic exercise training and inducible inflammation: results of a randomized controlled trial in healthy, young adults. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 17, p. e010201, 2018.
175. SLUSHER, A. L.; ZÚÑIGA, T. M.; ACEVEDO, E. O. Maximal exercise alters the inflammatory phenotype and response of mononuclear cells. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 50, n. 4, p. 675-683, 2018.

176. STEINBERG, G. R.; HARDIE, D. G. New insights into activation and function of the AMPK. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 4, p. 255-272, 2023.
177. STEINBERG, G. R.; SCHERTZER, J. D. AMPK promotes macrophage fatty acid oxidative metabolism to mitigate inflammation: implications for diabetes and cardiovascular disease. **Immunology and Cell Biology**, v. 92, n. 4, p. 340-345, 2014.
178. STEIN, M. et al. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 1, p. 287-292, 1992.
179. STIFEL, U. et al. Glucocorticoids coordinate macrophage metabolism through the regulation of the tricarboxylic acid cycle. **Molecular Metabolism**, v. 57, p. 101424, 2022.
180. STOUT, R. D.; SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 3, p. 509-513, 2004.
181. STOUT, R. D. et al. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 342-349, 2005.
182. SUGIURA, H. et al. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 3, p. 789-794, 2001.
183. SUKUMARAN, A.; CHOI, K.; DASGUPTA, B. Insight on transcriptional regulation of the energy sensing AMPK and biosynthetic mTOR pathway genes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 671, 2020.
184. TANNAHILL, G. M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238-242, 2013.
185. TEH, Y. C. et al. Capturing the fantastic voyage of monocytes through time and space. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 834, 2019.

186. THALER, B. et al. Differential in vivo activation of monocyte subsets during low-grade inflammation through experimental endotoxemia in humans. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30162, 2016.
187. THOMAS, A. W. et al. Exercise-associated generation of PPAR $\gamma$  ligands activates PPAR $\gamma$  signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 5, p. 806-815, 2012.
188. THOMAS, D.; APOVIAN, C. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. **Metabolism**, v. 72, p. 120-143, 2017.
189. THOMPSON, B.; HAN, A. Methodological recommendations for menstrual cycle research in sports and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 51, n. 12, p. 2610-2617, 2019.
190. THWE, P. M.; AMIEL, E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of dendritic cell immune function. **Cancer Letters**, v. 412, p. 236-242, 2018.
191. TILG, H. et al. Adipokines: masterminds of metabolic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, p. 1-16, 2024.
192. TIPTON, C. M. Susruta of India, an unrecognized contributor to the history of exercise physiology. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 6, p. 1553-1556, 2008.
193. TREMBLAY, M. S. et al. Sedentary behavior research network (SBRN)—terminology consensus project process and outcome. **International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity**, v. 14, p. 1-17, 2017.
194. TSOTRA, P. C. et al. High insulin and leptin increase resistin and inflammatory cytokine production from human mononuclear cells. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 487081, 2013.
195. UNUVAR PURCU, D. et al. Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. **PLoS One**, v. 17, n. 3, p. e0265196, 2022.

196. VAN DEN BOSSCHE, J.; O'NEILL, L. A.; MENON, D. Macrophage immunometabolism: where are we (going)?. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 6, p. 395-406, 2017.
197. VASAMSETTI, S. B. et al. Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. **Diabetes**, v. 64, n. 6, p. 2028-2041, 2015.
198. VATS, D. et al. Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophage-mediated inflammation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 13-24, 2006.
199. VIJAYAN, V. et al. Human and murine macrophages exhibit differential metabolic responses to lipopolysaccharide-A divergent role for glycolysis. **Redox Biology**, v. 22, p. 101147, 2019.
200. VISHNYAKOVA, P. et al. The response of two polar monocyte subsets to inflammation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111614, 2021.
201. VOSKOBOYNIK, Y.; MCCULLOCH, A. D.; SAHOO, D. Macrophages on the run: Exercise balances macrophage polarization for improved health. **Molecular Metabolism**, v. 90, p. 102058, 2024.
202. WALTON, R. G. et al. Human skeletal muscle macrophages increase following cycle training and are associated with adaptations that may facilitate growth. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 969, 2019.
203. WAN, Z. et al. Reduction of AMPK activity and altered MAPKs signalling in peripheral blood mononuclear cells in response to acute glucose ingestion following a short-term high fat diet in young healthy men. **Metabolism**, v. 63, n. 9, p. 1209-1216, 2014.
204. WAN, X. et al. PGC1 $\alpha$  protects against hepatic steatosis and insulin resistance via enhancing IL10-mediated anti-inflammatory response. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 8, p. 10751-10761, 2020.

205. WANG, F. et al. Glycolytic stimulation is not a requirement for M2 macrophage differentiation. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 463-475, 2018.
206. WEDELL-NEERGAARD, A. S. et al. Cardiorespiratory fitness and the metabolic syndrome: Roles of inflammation and abdominal obesity. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0194991, 2018.
207. WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.
208. WINN, N. C. et al. Exercise and adipose tissue immunity: outrunning inflammation. **Obesity**, v. 29, n. 5, p. 790-801, 2021.
209. WOLF, A. A. et al. The ontogeny of monocyte subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1642, 2019.
210. WONG, K. L. et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. **Blood**, v. 118, n. 5, p. e16-e31, 2011.
211. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour**. World Health Organization, 2020.
212. WU, X. Q. et al. Emerging role of micro RNAs in regulating macrophage activation and polarization in immune response and inflammation. **Immunology**, v. 148, n. 3, p. 237-248, 2016.
213. XIONG, X. Q. et al. FNDC5 attenuates adipose tissue inflammation and insulin resistance via AMPK-mediated macrophage polarization in obesity. **Metabolism**, v. 83, p. 31-41, 2018.
214. XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

215. YAKEU, G. et al. Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPAR $\gamma$  and Th2 cytokines. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 2, p. 668-673, 2010.
216. YEUNG, F. et al. Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 12, p. 2369-2380, 2004.
217. YU, L. et al. A glimpse of the connection between PPAR $\gamma$  and macrophage. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1254317, 2023.
218. ZHENYU, L. et al. Exercise-mediated macrophage polarization modulates the targeted therapeutic effect of NAFLD: a review. **Physical Activity and Nutrition**, v. 27, n. 3, p. 10, 2023.
219. ZHAO, M. et al. HuoXueTongFu Formula Alleviates Intraperitoneal Adhesion by Regulating Macrophage Polarization and the SOCS/JAK2/STAT/PPAR- $\gamma$  Signalling Pathway. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, n. 1, p. 1769374, 2019.
220. ZHU, Y. P. et al. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates IL-10-mediated anti-inflammatory signaling pathways in macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 2, p. 584-594, 2015.

## ANEXOS

### ANEXO 1 - Tabela Suplementar 1. Caracterização da amostra

Variável	Comparações entre os grupos		Diferença média	Erro Padrão	Sig	Δ	Classificação
Idade (anos)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	26,536	3,094	<,001	5,074	Alto
		Jovens-Baixa ACR	22,952	2,843	<,001	3,327	Alto
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-3,583	2,728	,481	0,518	Médio
Altura (metros)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	-,0155	,0305	,940	0,333	Pequeno
		Jovens-Baixa ACR	-,0217	,0280	,822	0,333	Pequeno
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-,006	,0269	,994	0,000	Irrisório
IMC	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	2,783	2,307	,550	0,815	Alto
		Jovens-Baixa ACR	-3,762	2,120	,237	0,675	Médio
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-6,546	2,034	,011	1,173	Alto
Massa de Gordura (Kg)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	6,582	4,246	,343	1,566	Alto
		Jovens-Baixa ACR	-13,260	3,902	,007	1,235	Alto
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-19,842	3,745	<,001	1,849	Alto
Massa Magra (Kg)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	0,585	4,398	,999	0,060	Irrisório
		Jovens-Baixa ACR	-0,480	4,042	,999	0,057	Irrisório
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-1,066	3,879	,990	0,126	Irrisório
Massa Sem Gordura (Kg)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	0,576	4,559	,999	0,056	Irrisório
		Jovens-Baixa ACR	-0,281	4,189	1,000	0,032	Irrisório
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-0,858	4,021	,995	0,097	Irrisório
Massa Corporal (Kg)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	7,157	7,796	,738	0,572	Médio
		Jovens-Baixa ACR	-13,542	7,164	,193	0,746	Médio
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-20,700	6,875	,018	1,139	Alto
% Gordura Andróide	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	13,498	4,753	,027	2,389	Alto
		Jovens-Baixa ACR	-12,489	4,367	,025	1,303	Alto
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-25,987	4,191	<,001	2,712	Alto
% Gordura Ginóide	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	7,128	3,236	,106	1,323	Alto
		Jovens-Baixa ACR	-12,988	2,974	<,001	1,956	Alto
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-20,116	2,854	<,001	3,028	Alto
Gordura Visceral (gramas)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	498,554	215,787	,123	3,772	Alto
		Jovens-Baixa ACR	-268,026	261,304	,575	0,522	Médio
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-766,580	161,498	,001	1,495	Alto
	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	512,607	221,480	,122	3,660	Alto

Gordura Visceral (cm <sup>2</sup> )		Jovens-Baixa ACR	-299,870	271,027	,528	0,551	Médio
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-812,477	171,186	<b>,001</b>	1,493	Alto
VO <sub>2</sub> pico (mL/Kg/min)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	-2,763	2,586	,641	0,586	Médio
		Jovens-Baixa ACR	17,160	2,377	<b>&lt;,001</b>	4,155	Alto
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	19,923	2,281	<b>&lt;,001</b>	4,823	Alto
VO <sub>2</sub> pico (mL/Kg.MM/min)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	4,838	3,539	,447	0,524	Médio
		Jovens-Baixa ACR	14,388	3,252	<b>&lt;,001</b>	2,942	Alto
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	9,549	3,121	<b>,016</b>	1,957	Alto
Sedentary behavior (h/day)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	-,894	1,679	,932	0,420	Médio
		Jovens-Baixa ACR	-4,710	1,543	<b>,016</b>	1,097	Alto
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-3,816	1,480	<b>,048</b>	0,420	Médio
						<b>r</b>	<b>Classificação</b>
AF leve (min/dia)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	12,092	15,029	n.s	-	-
		Jovens-Baixa ACR	15,233	13,811	n.s	-	-
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	3,141	13,254	n.s	-	-
AF moderada (min/dia)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	26,069	43,297	n.s	-	-
		Jovens-Baixa ACR	-8,454	39,787	n.s	-	-
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-34,524	38,184	n.s	-	-
AF moderada/vigorosa (min/dia)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	19,436	47,365	n.s	-	-
		Jovens-Baixa ACR	16,935	43,525	n.s	-	-
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	-2,500	41,772	n.s	-	-
AF vigorosa (min/dia)	Meia idade-Alta ACR	Jovens-Alta ACR	-6,633	4,051	1,000	0,03	Irrisório
		Jovens-Baixa ACR	25,390	3,723	0,137	0,46	Médio
	Jovens-Alta ACR	Jovens-Baixa ACR	32,024	3,573	<b>,077</b>	0,50	Alto

**Nota:**  $\Delta$  = Delta de Glass;  $r$  =  $r$  de correlação de postos; Classificação = classificação do tamanho de efeito; n.s. = hipótese nula rejeitada no teste de Kruskal Wallis, portanto, as múltiplas comparações não foram realizadas.

## ANEXO 2 – Aprovação Comitê de Ética

UNESP - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DO  
CAMPUS DE PRESIDENTE  
PRUDENTE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Polarização de macrófagos M1 e M2 em indivíduos com baixa e alta aptidão cardiorrespiratória: papel potencial do tecido adiposo, envelhecimento e leptina

**Pesquisador:** CAIQUE FIGUEIREDO

**Área Temática:**

**Versão:** 6

**CAAE:** 93417018.1.0000.5402

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.349.796

#### Apresentação do Projeto:

Intitulada “Polarização de macrófagos M1 e M2 em indivíduos com baixa e alta aptidão cardiorrespiratória: papel potencial do tecido adiposo, envelhecimento e leptina”, a pesquisa é conduzida pelo Doutorando Caique de Figueiredo sob orientação da Prof. Dr. Fábio Santos de Lira, do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Estadual Paulista – FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente, em andamento de dezembro de 2018 até 28/03/2023 (informado pelo Doc. da PB de INFORMAÇÕES BÁSICAS). Deve-se levar em conta, frente ao choque de data de coleta de dados que se sobrepõe ao do presente Parecer provisório, que o doutorando incluiu nesta instância uma emenda, que é a adição de membros à equipe da pesquisa (Ricardo Aurino de Pinho, José César Rosa Neto, Luciene Guerra Minuzzi, Tiago Olean Oliveira, Bruna Spolador de Alencar Silva, Alexandre Abilio de Souza Teixeira e Camila de Souza Padilha e o próprio orientador)

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Examinar o impacto do tecido adiposo visceral e da leptina na polarização dos macrófagos em homens jovens e idosos com baixa e alta aptidão cardiorrespiratória. Objetivos secundários:

- Analisar in vitro a polarização de macrófagos para os fenótipos M1 e / ou M2 em jovens e idosos com diferentes aptidões cardiorrespiratórias e espessuras de gordura visceral. Analisar ainda a

**Endereço:** Rua Roberto Simonsen, 305 º Faculdade de Ciência e Tecnologia da Unesp º Prédio da Administração º SI 04  
**Bairro:** Centro Educacional **CEP:** 19.060-900  
**UF:** SP **Município:** PRESIDENTE PRUDENTE  
**Telefone:** (18)3229-5315 **Fax:** (18)3229-5300 **E-mail:** cep.fct@unesp.br

UNESP - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DO  
CAMPUS DE PRESIDENTE  
PRUDENTE



Continuação do Parecer: 5.349.796

expressão gênica (RT-PCR) e o sobrenadante do macrófago (ELISA).

- Avaliar a participação da leptina in vitro na polarização de macrófagos para os fenótipos M1 e / ou M2 em jovens e idosos com diferentes aptidões cardiorespiratórias e espessuras de gordura visceral. Isto, objetivando tratar macrófagos com leptina humana recombinante em um ambiente pró -inflamatório, antiinflamatório e neutro (apenas estímulos de sobrevivência e proliferação - M-CSF ou GM-CSF).
- Associar os parâmetros de desempenho com a capacidade de polarização de macrófagos para os fenótipos M1 e / ou M2.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Possíveis riscos de sofrer dores musculoesqueléticas quanto ao uso do cicloergômetro; No tocante à coleta de sangue, a punção periférica realizada na veia do antebraço pode provocar dores e/ou hematomas no local e, apesar de raros e passageiros, também é possível acontecer desmaios e/ou infecções. Ressalta-se que a punção será realizada por profissionais com formação e capacitados na área que tomarão todos os cuidados pertinentes. Por outro lado, a adesão por parte dos participantes será totalmente voluntária, e os mesmos foram/serão devidamente advertidos quanto às avaliações, procedimentos, riscos e finalidades. Os recintos de coleta (LaFICE e LIVE) são muito bem climatizados e higienizados e os protocolos de Saúde para enfrentamento da pandemia da COVID-19 foram/serão rigorosamente cumpridos. O pesquisador espera que este estudo traga informações importantes sobre os benefícios da prática regular do exercício e acesso a todas as informações dos testes aplicados, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa contribuir para melhora da qualidade de vida da população no âmbito nacional e mundial. Dessa forma, o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O pesquisador realizou/realizará testes físicos, análises do sangue coletado em 40 indivíduos entre 18 e 45, jovens e idosos, distribuídos em quatro grupos de dez cada, com intervenções resumidas nas seguintes etapas: (1) avaliação cardíaca; (2) avaliação da composição corporal; (3) avaliação da aptidão aeróbia e (4) coleta de sangue. Os testes físicos serão realizados na esteira e aparelhos que avaliam a gordura corporal. O sangue será coletado por técnicos de laboratório. As avaliações ocorrerão nas dependências do Laboratório de Fisiologia Celular e Exercício (informe do TCLE) e também no Laboratório de Investigações em Exercícios (Informe do Doc. de Informações Básicas do Projeto), ambos da FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente. Pressupõe-se que a

**Endereço:** Rua Roberto Simonsen, 305 ∩ Faculdade de Ciência e Tecnologia da Unesp ∩ Prédio da Administração ∩ SI 04  
**Bairro:** Centro Educacional **CEP:** 19.060-900  
**UF:** SP **Município:** PRESIDENTE PRUDENTE  
**Telefone:** (18)3229-5315 **Fax:** (18)3229-5300 **E-mail:** cep.fct@unesp.br

Página 02 de 05

**UNESP - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DO  
CAMPUS DE PRESIDENTE  
PRUDENTE**



Continuação do Parecer: 5.349.796

coleta e análise de dados já venha ocorrendo (de 01/02/2021 a 03/01/2022), embora o recrutamento de voluntários se iniciou em 25/01/2021 e se finalizará em 31/01/2023. Os voluntários foram/serão ainda previamente entrevistados e aplicados questionários para a verificação dos critérios de inclusão dos mesmos. Os resultados obtidos serão avaliados por meio de análises estatísticas utilizando o programa Biostat (versão 5.0). Todas as variáveis serão avaliadas quanto à normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Os dados serão analisados descritivamente e testes comparativos de média serão aplicados nestas variáveis para comparar os grupos estudados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos e arquivos em pdf (10 anexos), devidamente datados e assinados, são os seguintes:

- Folha de rosto, datado em 29/06/2018
- Formulário de Informações Básicas do Projeto da PB
- Termo de Consentimento do Participante (TCLE)
- Termo de Compromisso dos pesquisadores, datado em 02/07/2018
- Projeto detalhado
- Declaração de autorização do então chefe do Departamento de Educação Física, em 03/07/2018
- Declaração de medidas protetivas, assinada pelo doutorando e pesquisador
- Declaração de assentimento da Técnica de laboratório para os serviços de coleta de sangue
- Autorização de utilização do laboratório de Investigações em Exercícios e equipamento de avaliação da composição corporal (DEXA) no Laboratório de Investigações em Exercícios (LIVE) da FCT/UNESP
- Autorização de utilização do Laboratório de Fisiologia Celular e Exercício, sala 49, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista, assinada pelo orientador e responsável pelo Laboratório de Fisiologia Celular e Exercício (LaFiCE)

**Recomendações:**

Em vista de estar em consideração a emenda da pesquisa, subentende-se que o projeto recebeu prévia aprovação na instância do Comitê de Ética em Pesquisa. Não foi percebido algum entrave ético e legal (excluída a concomitância da coleta de dados com a redação deste parecer, por exemplo), admitindo-se a competência dos novos integrantes que se somam à equipe de trabalho como principal emenda dos pesquisadores. Esperamos que esta pesquisa seja culminada com o Relatório Final conclusivo a ser enviado a este CEP, onde poderá ser discriminado a atividade

**Endereço:** Rua Roberto Simonsen, 305 √ Faculdade de Ciência e Tecnologia da Unesp √ Prédio da Administração √ SI 04  
**Bairro:** Centro Educacional **CEP:** 19.060-900  
**UF:** SP **Município:** PRESIDENTE PRUDENTE  
**Telefone:** (18)3229-5315 **Fax:** (18)3229-5300 **E-mail:** cep.fct@unesp.br

**UNESP - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DO  
CAMPUS DE PRESIDENTE  
PRUDENTE**



Continuação do Parecer: 5.349.796

conjunta e individual de cada membro nomeado no item Apresentação do Projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Tendo em vista o relato retromencionado, manifesto meu consentimento em considerar a emenda (com este projeto) submetida ao momento presente, APROVADA.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em reunião realizada no dia 12.04.2022, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Tecnologia - Unesp - Presidente Prudente, em concordância com o parecerista, considerou a emenda APROVADA.

Obs: Lembramos que ao finalizar a pesquisa, o (a) pesquisador (a) deverá apresentar o relatório final.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_189698_5_E3.pdf	26/02/2022 21:57:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_assentimento.pdf	23/08/2021 08:50:06	CAIQUE FIGUEIREDO	Aceito
Outros	Declaracao_medidas_protetivas.pdf	20/01/2021 22:18:08	CAIQUE FIGUEIREDO	Aceito
Outros	Autorizacao_responsavel_LIVE.pdf	20/01/2021 21:59:32	CAIQUE FIGUEIREDO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Autorizacao_responsavel_LaFICE.pdf	20/01/2021 21:58:58	CAIQUE FIGUEIREDO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	26/11/2020 12:17:14	CAIQUE FIGUEIREDO	Aceito
Outros	assentimento_tecnica.pdf	05/10/2018 20:22:38	CAIQUE FIGUEIREDO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_compromisso.pdf	05/07/2018 00:37:10	CAIQUE FIGUEIREDO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao.pdf	04/07/2018 18:32:51	CAIQUE FIGUEIREDO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	04/07/2018	CAIQUE	Aceito

**Endereço:** Rua Roberto Simonsen, 305 º Faculdade de Ciência e Tecnologia da Unesp º Prédio da Administração º SI 04  
**Bairro:** Centro Educacional **CEP:** 19.060-900  
**UF:** SP **Município:** PRESIDENTE PRUDENTE  
**Telefone:** (18)3229-5315 **Fax:** (18)3229-5300 **E-mail:** cep.fct@unesp.br

UNESP - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DO  
CAMPUS DE PRESIDENTE  
PRUDENTE



Continuação do Parecer: 5.349.796

Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	18:29:27	FIGUEIREDO	Aceito
----------------	--------------------	----------	------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PRESIDENTE PRUDENTE, 13 de Abril de 2022

---

**Assinado por:**  
**Edna Maria do Carmo**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Roberto Simonsen, 305 º Faculdade de Ciência e Tecnologia da Unesp º Prédio da Administração º SI 04  
**Bairro:** Centro Educacional **CEP:** 19.060-900  
**UF:** SP **Município:** PRESIDENTE PRUDENTE  
**Telefone:** (18)3229-5315 **Fax:** (18)3229-5300 **E-mail:** cep.fct@unesp.br

## ANEXO 3 – IPAC

03/02/25, 17:01

IPAQ - Questionário Internacional de Atividade Física (versão curta)

## IPAQ - Questionário Internacional de Atividade Física (versão curta)

As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gastou fazendo atividade física na ÚLTIMA semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são MUITO importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo.

\* Indica uma pergunta obrigatória

1. Nome \*

---

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal;
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal.

2. Em quantos dias da última semana você caminhou por pelo menos 10 minutos \*  
contínuos em casa, na escola ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

Marcar apenas uma oval.

- 1 dia por semana.
- 2 dias por semana.
- 3 dias por semana.
- 4 dias por semana.
- 5 dias por semana.
- 6 dias por semana.
- 7 dias por semana.
- Nenhum

3. Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou caminhando por dia? \*

Descreva o total de HORAS e MINUTOS.

---

4. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades MODERADAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar moderadamente sua respiração ou batimentos do coração? (NÃO INCLUA CAMINHADA) \*

*Marcar apenas uma oval.*

- 1 dia por semana.
- 2 dias por semana.
- 3 dias por semana.
- 4 dias por semana.
- 5 dias por semana.
- 6 dias por semana
- 7 dias por semana
- Nenhum

5. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia? \*

Descreva o total de HORAS e MINUTOS.

---

6. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades VIGOROSAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo, correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar MUITO sua respiração ou batimentos do coração? \*

*Marcar apenas uma oval.*

- 1 dia por semana.  
 2 dias por semana.  
 3 dias por semana.  
 4 dias por semana.  
 5 dias por semana.  
 6 dias por semana  
 7 dias por semana  
 Nenhum

7. Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia? \*

Descreva o total de HORAS e MINUTOS.

---

8. Quanto tempo por dia você fica sentado em um dia da semana? \*

Descreva o total de HORAS e minutos

---

9. Quanto tempo por dia você fica sentado no final de semana? \*

Descreva o total de HORAS e MINUTOS

---

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google.

<https://docs.google.com/forms/d/1bUi1ICtffV9sfYMQK6CtejcCIDOSTwbTIOJxqy8ETE/edit>

3/4

03/02/25, 17:01

IPAQ - Questionário Internacional de Atividade Física (versão curta)

Google Formulários

<https://docs.google.com/forms/d/1bUi1CtffV9sfYMQK6CtejcCIDOSTwbTIOJxqy8ETE/edit>

4/4

## ANEXO 4 – Registro alimentar

03/02/25, 17:03

Registro Alimentar

### Registro Alimentar

Durante **3 dias não consecutivos**, você deverá anotar REGISTRAR o que INGERIR, com exceção da água. Lembre-se que deve haver um registro no **SÁBADO** e os outros durante a semana.

#### ORIENTAÇÕES GERAIS

- Escreva tudo o que comer, desde a hora que acordar até a hora que for dormir à noite.
- Anote logo após comer para não se esquecer de anotar nada.
- Quando comer um sanduíche, terá de anotar os ingredientes e as quantidades contidos nele (ex: misto quente – 1 fatia de presunto, 1 fatia de queijo, 1 ponta de faca com pequena quantidade de maionese).
- Lembre-se de anotar detalhes como a adição de açúcar, sal, óleo e molhos.
- Anote a quantidade dos alimentos consumidos em MEDIDAS CASEIRAS: colher (de servir, sopa, sobremesa, chá ou café; escumadeira ou concha; copo (americano, requeijão ou duplo/grande); xícara: de café ou de chá.

\* Indica uma pergunta obrigatória

1. **Coloque o seu nome abaixo:** \*

---

2. **Sexo:** \*

Marque todas que se aplicam.

- Feminino  
 Masculino

3. **Data:** \*

Coloque a data da sua refeição

---

Exemplo: 7 de janeiro de 2019

03/02/25, 17:03

Registro Alimentar

4. **Dia da Semana:** \*

*Selecione o dia da semana.*

*Marque todas que se aplicam.*

- Segunda-feira
- Terça-feira
- Quarta-feira
- Quinta-feira
- Sexta-feira
- Sábado
- Domingo

5. **Refeição 1** \*

Identifique a refeição: (ex: café da manhã, almoço, jantar, lanche, belisco).

*Marque todas que se aplicam.*

- Café da manhã
- Almoço
- Jantar
- Lanche
- Belisco

6. **Hora:** \*

*Coloque a hora da sua refeição no formato de 24 horas (ex: seleciona café da manhã, hora 10:00, seleciona janta, hora 20:30 min).*

*Exemplo: 08h30*

7. **Descreva sua refeição.** \*

*Neste espaço descreva corretamente o que você consumiu na refeição selecionada, contendo quantidades, gramas, marcas dos alimentos.*

---



---



---



---



---

8. **Insira abaixo a imagem da sua refeição.**

Arquivos enviados:

9. **Refeição 2** \*

*Identifique a refeição: (ex: café da manhã, almoço, jantar, lanche, belisco).*

*Marque todas que se aplicam.*

- Café da manhã
- Almoço
- Jantar
- Lanche
- Belisco

10. **Hora:** \*

*Coloque a hora da sua refeição no formato de 24 horas (ex: seleciona café da manhã, hora 10:00, seleciona janta, hora 20:30 min).*

*Exemplo: 08h30*

---

03/02/25, 17:03

Registro Alimentar

11. **Descreva sua refeição.** \*

Neste espaço descreva corretamente o que você consumiu na refeição selecionada, contendo quantidades, gramas, marcas dos alimentos.

---

---

---

---

---

12. **Insira abaixo a imagem da sua refeição.**

Arquivos enviados:

13. **Refeição 3** \*

Identifique a refeição: (ex: café da manhã, almoço, jantar, lanche, belisco).

Marque todas que se aplicam.

- Café da manhã
- Almoço
- Jantar
- Lanche
- Belisco

14. **Hora:** \*

Coloque a hora da sua refeição no formato de 24 horas (ex: seleciona café da manhã, hora 10:00, seleciona janta, hora 20:30 min).

---

Exemplo: 08h30

03/02/25, 17:03

Registro Alimentar

15. **Descreva sua refeição.** \*

Neste espaço descreva corretamente o que você consumiu na refeição selecionada, contendo quantidades, gramas, marcas dos alimentos.

---

---

---

---

---

16. **Insira abaixo a imagem da sua refeição.**

Arquivos enviados:

17. **Refeição 4**

Identifique a refeição: (ex: café da manhã, almoço, jantar, lanche, belisco).

Marque todas que se aplicam.

- Café da manhã
- Almoço
- Jantar
- Lanche
- Belisco

18. **Hora:**

Coloque a hora da sua refeição no formato de 24 horas (ex: seleciona café da manhã, hora 10:00, seleciona janta, hora 20:30 min).

Exemplo: 08h30

03/02/25, 17:03

Registro Alimentar

**19. Descreva sua refeição.**

Neste espaço descreva corretamente o que você consumiu na refeição selecionada, contendo quantidades, gramas, marcas dos alimentos.

---

---

---

---

---

**20. Insira abaixo a imagem da sua refeição.**

Arquivos enviados:

**21. Refeição 5**

Identifique a refeição: (ex: café da manhã, almoço, jantar, lanche, belisco).

Marque todas que se aplicam.

- Café da manhã
- Almoço
- Jantar
- Lanche
- Belisco

**22. Hora:**

Coloque a hora da sua refeição no formato de 24 horas (ex: seleciona café da manhã, hora 10:00, seleciona janta, hora 20:30 min).

---

Exemplo: 08h30

03/02/25, 17:03

Registro Alimentar

**23. Descreva sua refeição.**

Neste espaço descreva corretamente o que você consumiu na refeição selecionada, contendo quantidades, gramas, marcas dos alimentos.

---

---

---

---

---

**24. Insira abaixo a imagem da sua refeição.**

Arquivos enviados:

**25. Refeição 6**

Identifique a refeição: (ex: café da manhã, almoço, jantar, lanche, belisco).

Marque todas que se aplicam.

- Café da manhã
- Almoço
- Jantar
- Lanche
- Belisco

**26. Hora:**

Coloque a hora da sua refeição no formato de 24 horas (ex: seleciona café da manhã, hora 10:00, seleciona janta, hora 20:30 min).

---

Exemplo: 08h30

03/02/25, 17:03

Registro Alimentar

**27. Descreva sua refeição.**

Neste espaço descreva corretamente o que você consumiu na refeição selecionada, contendo quantidades, gramas, marcas dos alimentos.

---

---

---

---

---

**28. Insira abaixo a imagem da sua refeição.**

Arquivos enviados:

**29. Refeição 7**

Identifique a refeição: (ex: café da manhã, almoço, jantar, lanche, belisco).

Marque todas que se aplicam.

- Café da manhã
- Almoço
- Jantar
- Lanche
- Belisco

**30. Hora:**

Coloque a hora da sua refeição no formato de 24 horas (ex: seleciona café da manhã, hora 10:00, seleciona janta, hora 20:30 min).

---

Exemplo: 08h30

03/02/25, 17:03

Registro Alimentar

**31. Descreva sua refeição.**

Neste espaço descreva corretamente o que você consumiu na refeição selecionada, contendo quantidades, gramas, marcas dos alimentos.

---

---

---

---

---

**32. Insira abaixo a imagem da sua refeição.**

Arquivos enviados:

**33. Refeição 8**

Identifique a refeição: (ex: café da manhã, almoço, jantar, lanche, belisco).

Marque todas que se aplicam.

- Café da manhã
- Almoço
- Jantar
- Lanche
- Belisco

**34. Hora:**

Coloque a hora da sua refeição no formato de 24 horas (ex: seleciona café da manhã, hora 10:00, seleciona janta, hora 20:30 min).

---

Exemplo: 08h30