
EDUCAÇÃO FÍSICA

Isabela Aparecida Dosualdo Preto

**MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO
TECIDO ADIPOSEO MARROM: O PAPEL DO
EXERCÍCIO FÍSICO CRÔNICO NA
INFILTRAÇÃO E POLARIZAÇÃO DE
MACRÓFAGOS.**

Isabela Aparecida Dosualdo Preto

MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO TECIDO ADIPOSEO
MARROM: O PAPEL DO EXERCÍCIO FÍSICO CRÔNICO NA
INFILTRAÇÃO E POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Rio
Claro, para obtenção do grau de bacharela em
Educação Física.

Rio Claro

2016

617.1027 Preto, Isabela Aparecida Dosualdo
P942m Modulação da inflamação no tecido adiposo marrom : o papel do
exercício físico crônico na infiltração e polarização de macrófagos /
Isabela Aparecida Dosualdo Preto. - Rio Claro, 2016
35 f. : il., figs., gráfs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Educação física) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Alexandre Gabarra de Oliveira

1. Medicina esportiva. 2. Resistência à insulina. 3. Macrófagos. 4.
Tecido adiposo marrom. I. Título.

Dedico este trabalho á minha família
e amigos por tornarem esses anos
de faculdades os melhores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos meus pais Francisco e Gina e ao meu irmão Igor por todo apoio e incentivo que me deram á minha família, todos os bons e velhos amigos que sempre estiveram comigo, em especial Mariana Rodrigues, Daniela Rodrigues, Mariana Ricci, Aline, Gabriela, Valentim, Pacheco. Aos amigos da turma 3 que estiveram presentes durante toda essa fase universitária , Daniela Ambrósio, Yasmin, Giovanna, Marcelle, Marcus, Luan, Luis Felipe , ao meu namorado Guilherme e todos aqueles que contribuíram de alguma forma na minha caminhada.

Aos colegas e técnicos do laboratório LABIMEF, em especial para Carolina Pasqual, Ana Carolina Gáspari, Igor Domingues, Kyusk, Clarice Kokubun ,Beto , China e ao meu orientador Alexandre Gabarra de Oliveira gostaria de agradecer por estarem presente por todo esse processo, pela paciência e dedicação em ensinar todos os processos realizados no projeto, e pelo vínculo de parceira que o laboratório trouxe entre todos os integrantes.

Gostaria de agradecer também ao laboratório LICRI (Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina) da UNICAMP, Dioze Guadagnini, Mario Saad, Andrey Santos, Any Elisa Gonçalves por todo auxílio e apoio realizado durante o projeto.

RESUMO

No contexto inflamatório, atualmente associado com a obesidade e resistência à insulina, há um crescente interesse sobre o papel dos macrófagos, visto que estes se acumulam no tecido adiposo branco num quadro de obesidade e também por apresentarem relação com os parâmetros de resistência à insulina. Os macrófagos podem apresentar dois tipos de ativação, uma pro-inflamatória conhecida como M1 ou clássica, caracterizada pelo predomínio de citocinas inflamatórias (TNF- α e iNOS) e associada à resistência à insulina; e outra anti-inflamatória denominada M2 ou alternativa onde há o predomínio de substâncias anti-inflamatórias (IL-10 e arginase-I) e relação com melhora na sensibilidade à insulina. Paralelamente, torna-se cada vez mais evidente que o exercício físico pode ser uma terapia útil para o tratamento da resistência à insulina em decorrência da obesidade, uma vez que apresenta efeito anti-inflamatório e é capaz de promover o aumento da sinalização e da sensibilidade à insulina. Evidências recentes demonstraram efeito benéfico do exercício físico (agudo e crônico) na polarização de macrófagos do tecido adiposo branco de roedores obesos. Entretanto, permanece ainda incerto o efeito do exercício físico na infiltração e polarização de macrófagos no tecido adiposo marrom. Assim, nesse projeto, foi investigado o efeito da dieta hiperlipídica e do exercício físico crônico sobre a infiltração e a polarização de macrófagos no tecido adiposo marrom. Para tanto, foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, que ao atingirem 6 semanas de idade foram divididos nos seguintes grupos: animais controle alimentados com dieta padrão para roedores (CTL), animais obesos alimentados com dieta hiperlipídica sedentários (DH) ou exercitados (DH+EC). O protocolo de exercício consistiu em natação por 1 hora, 5 dias por semana, durante 8 semanas, suportando uma carga progressivamente aumentada até 5% do peso corporal. Para avaliação da infiltração e polarização de macrófagos foram utilizadas as técnicas de imunoblotting, análise de RNAm e também estudos histológicos (imunohistoquímica e imunofluorescência). Além disso, também foram realizados testes de tolerância à glicose e também à insulina. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão e para análise estatística utilizamos a análise de variância (ANOVA) e pós-teste Bonferroni. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os resultados demonstraram que o grupo DH+EC não obteve atenuação significativa do ganho de peso, contudo demonstrou redução no acúmulo de gordura no tecido adiposo branco e um importante aumento do tecido adiposo marrom. Além disso, esse grupo apresentou proteção ao desenvolvimento de intolerância à glicose e também à insulina, associadas à importante redução na infiltração de macrófagos e aumento na polarização de macrófagos do tipo M2, o que resultou na diminuição de citocinas pró-inflamatórias circulantes. Dessa forma, os resultados obtidos nesse estudo nos permitem concluir que o exercício foi capaz direcionar o conteúdo lipídico da dieta para o tecido marrom em detrimento do tecido adiposo branco e também promover a atenuação da infiltração de macrófagos, bem como a manutenção da polarização M2.

Palavras-Chaves: Resistência à insulina, macrófagos, tecido adiposo marrom.

ABSTRACT

In inflammatory context, currently associated with obesity and insulin resistance, there is a growing interest in the role of macrophages, since they accumulate in adipose tissue in obese above and also for presenting relation with insulin resistance parameters. Macrophages can present two types of activation, a pro-inflammatory known as M1 or classical, characterized by the predominance of inflammatory cytokines (TNF and iNOS) and associated with insulin resistance; and another anti-inflammatory or alternatively named M2 where there is a predominance of anti-inflammatory substances (IL-10 and arginase-I) and related improvement in insulin sensitivity. Meanwhile, increasingly evident it becomes the exercise can be a useful therapy for the treatment of insulin resistance due to obesity, since it exhibits anti-inflammatory effect and is capable of promoting increased signaling and sensitivity insulin. Recent evidence demonstrated beneficial effect of physical exercise (acute and chronic) in the polarization of the white adipose tissue macrophages in obese rodents. However, it remains unclear the effect of high fat diet and exercise in infiltration and macrophage polarization in brown adipose tissue. Thus, in this project, we investigated the effect of high fat diet and chronic exercise on infiltration and macrophage polarization in brown adipose tissue. rats were used Wistar that when they reach 6 weeks of age were divided into the following groups: control animals fed a standard diet (CTL), obese animals fed high fat diet sedentary (DH) and exercised (DH+EC). The groups have infiltration and macrophage polarization evaluated over 8 weeks. The exercises consist in swimming for 1 hour per day, five days per week for 8 weeks, supporting a load that is increased gradually to 5% of body weight. For evaluation of infiltration and macrophage polarization we use the immunoblotting techniques of mRNA analysis and also histological studies (immunohistochemistry and immunofluorescence). In addition, we also conducted the glucose tolerance tests and also insulin. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation and statistical analysis we used analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-test. The significance level was set at $p < 0.05$. The results showed that DH + EC group despite not get a significant loss of body weight, showed a decrease in the fat accumulation into the white adipose tissue, along with an increase in brown adipose tissue. In addition. This group also demonstrated an important protection against the development of insulin resistance, along with attenuation in macrophage infiltration and increased polarization of M2 macrophages, which in turn resulted in reduction of circulating pro-inflammatory cytokines. Thus, in sum our results demonstrated that exercise was able to drive the lipid accumulation to brown adipose tissue instead white adipose tissue, to promote an anti-inflammatory effect in brown adipose tissue as evidenced by reducing macrophage infiltration along with increasing polarization towards M2 activation.

Keywords: Insulin resistance, macrophage, brown adipose tissue

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	8
2.OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivo Específico.....	12
3. MÉTODOS	13
3.1.Programa de treinamento físico crônico	13
3.2.Teste de tolerância á glicose.....	13
3.3.Teste de tolerância á insulina	13
3.4.Extração de Tecidos.....	13
3.5. Análise proteica por immunoblotting.....	14
3.6.Microscopia óptica.....	14
3.7.RT-PCR em tempo real.....	14
3.8.Imunofluorescência.....	15
3.9.Imunohistoquímica.....	15
3.10 .Análise de Resultados.....	15
4. RESULTADOS.....	16
4.1.Peso Corporal.....	16
4.2.Caracterização das gorduras.....	17
4.3.Teste de Tolerância á glicose	18
4.4.Teste de Tolerância á insulina.....	20
4.5.Caracterização Morfológica do Tecido Adiposo Marrom.....	21
4.6.Caracterização da Infiltração de Macrófagos.....	22
4.7.Caracterização da Polarização de Macrófagos.....	23
4.8.Efeitos da dieta e exercício sobre as citocinas.....	24
5.DISSCUSSÃO.....	25
7.CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
GLOSSÁRIO.....	35

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos uma avalanche de evidências tem apontado para a correlação entre resistência à insulina (RI) e um processo inflamatório subclínico e crônico (DANONA et al., 1998 ; KAHN; FLIER, 2000; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2003, 2005 ;XU et al., 2003). Esse processo tem se mostrado como um dos principais mecanismos para o desenvolvimento do quadro de RI em adipócitos, hepatócitos e miócitos (KAHN; FLIER, 2000; PICKUP; CROOK, 1998,2004; YAMUCHI et al., 2001). Nesse contexto, inflamatório da RI há um crescente interesse sobre o papel das células imunológicas, principalmente dos macrófagos, visto que estes podem se acumular no tecido adiposo branco (TAB) e no fígado em quadros de obesidade (BAI; SUN, 2015; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; MRAZ; HALUZIK, 2014; SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008; SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007; WEISBERG et al., 2003).

Um elegante estudo demonstrou que a inibição da infiltração de macrófagos para o TAB promovia importante redução na inflamação, além de melhorar a sensibilidade à insulina (SUGANAMI; OGAWA, 2010). Além disso, a redução do peso corporal está associada com diminuição tanto na inflamação quanto na quantidade de macrófagos presentes no TAB, o que reforça ainda mais a relação direta entre obesidade e a infiltração de macrófagos (CANCELLO et al., 2005, 2006).

A infiltração de macrófagos no TAB, em consequência do ganho de peso, parece ser um dos componentes chaves na progressão da RI, ao menos nesse tecido (HOTAMISLIGIL, 2006; LUMENG et al., 2008). Estudos anteriores demonstram, de forma consistente, que a infiltração de macrófagos no TAB parece ser suficiente para o desenvolvimento da RI em decorrência da obesidade (KAMEI et al., 2006; KANDA et al., 2006) Dando suporte a essa ideia, a infiltração de macrófagos e a expressão de genes relacionados à inflamação parecem preceder o início da RI em animais obesos (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003).

No entanto, nem todo macrófago presente no TAB apresenta fenótipo inflamatório (LUMENG et al., 2008). No intuito de facilitar sua atividade imunológica e para manter a homeostase tecidual os macrófagos presentes no TAB assumem

diferentes tipos de ativação que podem ser classificadas através do modelo de polarização M1/M2 (MARTINEZ et al., 2008). Os macrófagos M1 ou de ativação clássica, apresentam atividade antimicrobiana através da produção de citocinas pró-inflamatórias e produção de óxido nítrico em resposta a estímulos inflamatórios como lipolissacarídeo (LPS) e interferon- γ (MORRIS; SINGER; LUMENG, 2010). Ao passo que, a influência das citocinas T_H2 promove ativação M2, denominada anti-inflamatória ou alternativa (LUMENG; BODZIN; SALTIER, 2007; MARTINEZ et al., 2008)

Evidências mostraram que a dieta hiperlipídica promove a polarização de macrófagos de M2 para M1 (LUMENG; BODZIN; SALTIER, 2007), o que acarreta em aumento da secreção de citocinas inflamatórias como MCP-1 e TNF- α entre outras (GORDON; TAYLOR, 2003, 2005; MANTOVANI et al., 2004). Em contrapartida, estudos indicam que os animais magros apresentam predominância de macrófagos M2 no intuito principal de reduzir a inflamação (GORDON, 2003; LUMENG; BODZIN; SALTIER, 2007; MANTOVANI et al., 2004).

A importância da relação entre macrófagos M1 e M2 para o metabolismo da glicose foi demonstrada em um elegante estudo, no qual camundongos com deficiência para ativação do tipo M2 apresentaram aumento na inflamação do TAB, agravando o grau de RI desses animais quando comparados aos seus controles (HEVENER et al., 2007; ODEGAARD et al., 2007). Foi também demonstrado recuperação da sensibilidade à insulina através da redução das células positivas CD11c ou anulação de alguns marcadores de macrófago M1 como o TNF- α (UYSAL et al., 1997 ; WEISBERG et al., 2006 ; PATSOURIS et al., 2008). Fortalecendo esse papel da polarização M2 em promover maior sensibilidade à insulina, sua citocina característica, a IL-10 foi fortemente associada com melhora da captação de glicose mediada pela insulina em adipócitos. (LUMENG; BODZIN; SALTIER, 2007).

O TAB e o tecido adiposo marrom (TAM) apresentam funções fisiológicas bem distintas, enquanto primeiro funciona como órgão endócrino e depósito energético (FAIN et al., 2004; FANTUZZI, 2005), o papel do TAM consiste em metabolizar ácidos graxos e gerar calor, funções resultantes do alto conteúdo mitocondrial, associadas ao gasto energético e a manutenção do peso corporal

(SPIEGELMAN; FLIER, 2001). Associa-se ainda o TAM como um possível protetor contra a RI normalmente induzida pela dieta hiperlipídica (HAMANN, FLIER, LOWELL, 1996), entretanto os mecanismos para esse efeito são ainda pouco compreendidos. Ainda nesse contexto, já está bem estabelecido que o TAM torna-se mais ativo como resposta à ingestão calórica excessiva, processo esse conhecido como termogênese induzida pela dieta (NEDERGAARD et al., 2001 ;YOUNG et al., 1982). Dessa forma, a busca por estratégias farmacológicas ou fisiológicas para aumentar a quantidade ou mesmo a atividade desse tecido parecem ser de grande valia para o tratamento ou até mesmo a prevenção ao desenvolvimento da obesidade e possivelmente da RI. Nesse sentido, devido ao fato do TAM apresentar alguma semelhança com o tecido muscular, levanta-se a hipótese de que o exercício físico aeróbico poderia induzir tais importantes alterações no TAM.

O TAM também apresenta macrófagos residentes e pode apresentar infiltração de macrófagos em decorrência da obesidade (HENRICHOT et al., 2005; HERRERO et al.,2005). Os macrófagos do TAM, em condições fisiológicas, parecem se assemelhar mais com os apresentados pelo tecido muscular, ou seja, perfil angiogênico e anti-inflamatório (YUDKIN; ERINGA; STEHOUWER, 2005). Por conseguinte mais estudos são necessários para elucidar o comportamento dos macrófagos do TAM na obesidade e também o efeito do exercício sobre sua polarização.

Recentemente, foi demonstrado que a exposição à baixa temperatura (4°C) rapidamente promovia a ativação M2 nos macrófagos do tecido adiposo, que passavam a secretar catecolaminas, resultando em indução da expressão de genes ligados a termogênese no TAM e lipólise no TAB (NGUYEN et al., 2011). Esse estudo demonstrou ainda que estas atividades atribuídas ao TAM e ao TAB em resposta ao frio estavam associadas à polarização M2. Assim, a polarização de macrófagos de M2 para M1 decorrente da obesidade, deve repercutir negativamente na atividade termogênica do TAM e, conseqüentemente, contribuir para o ganho de peso e o desenvolvimento da RI. Por outro lado, estratégias que consigam polarizar os macrófagos no sentido oposto, ou seja, de M1 para M2 podem contribuir de sobremaneira para a melhora no quadro inflamatório e conseqüentemente na RI.

Paralelamente, torna-se cada vez mais claro que o exercício físico pode ser uma terapia extremamente útil no tratamento da RI, uma vez que ele possui efeitos anti-inflamatórios e melhora a sinalização e sensibilidade à insulina na obesidade (BRADLEY et al., 2008; BRUUN et al., 2006; GREIWE et al., 2001; KASAPIS; THOMPSON, 2005; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). (ROPELLE et al., 2006). Em um estudo prévio demonstrou-se que exercício físico, com intensidade de leve a moderada, é capaz de reduzir a inflamação no músculo esquelético, no TAB e também no fígado através da atenuação da via do toll-like receptor 4 (TLR4), o que culminou na melhora da sensibilidade à insulina em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (OLIVEIRA, 2012). Corroborando com o papel do exercício na polarização de macrófagos, dois estudos demonstraram que tanto exercício físico crônico quanto o agudo são capazes de promover a polarização tipo M2 em TAB de ratos obesos (KAWANISHI et al., 2010 ; OLIVEIRA et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação, ao longo de 8 semanas, na infiltração e no balanço da polarização de macrófagos no tecido adiposo marrom em ratos *Wistar*, através de estudos histológicos e da expressão de proteínas e genes ligados aos perfis M1 e M2.

2.2 Objetivos Específico

Investigar o efeito da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação no tecido adiposo marrom na expressão de: - F4/80 (infiltração); TNF- α , MCP-1 (polarização M1); MGL-1 e IL-10 (polarização M2).

3. MÉTODOS

3.1 Programa de treinamento físico crônico. Que consistiu de natação, em grupos de quatro animais, onde eles se exercitaram 1 hora por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas, suportando uma carga começou com 1% na segunda semana e alcançou o máximo de 5% do peso corporal até a última semana. Vale ressaltar que a carga foi ajustada semanalmente de acordo com o peso do animal na semana, mesmo quando não houve incremento na porcentagem da carga. Este protocolo tem sido previamente utilizado (LUCIANO, 2002; OLIVEIRA, 2012).

3.2 Testes de tolerância intraperitoneal à insulina. Os testes foram realizados após a primeira, a quarta e a oitava semana de exercícios físicos. Os animais estavam em jejum de seis horas. Nesse momento foi coletada a primeira amostra de sangue de cada animal, sendo essa considerada o tempo zero. Após isso, a insulina (1,5U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue colhidas nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica.

3.3 Verificação do nível de glicose sanguínea e teste de tolerância à glicose. Depois de finalizados os protocolos, os animais foram submetidos a um jejum de 6 horas e as amostras sanguíneas foram coletadas da cauda. O nível de glicose sanguínea foi aferido utilizando-se um glicosímetro (Advantage. Boehringer Mannheim, USA). O teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipGTT) foi realizado em jejum. Após coletar sangue de uma amostra não desafiada (tempo 0), uma solução de 20% de glicose (2.0g/kg peso corporal) foi intraperitonealmente administrada e amostras coletadas nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos e medida utilizando-se um glicosímetro.

3.4 Extração de Tecidos. Os animais foram anestesiados com Tiopental (15mg/kg) intraperitonealmente e utilizados após abolição do reflexo corneano e a retirada da pata à dor. A cavidade abdominal foi aberta e as amostras teciduais foram coletadas a fim de realizar análises de proteínas, RNA e estudos histológicos.

3.5 Análise Proteica por Immunoblotting. Os precipitados obtidos, após serem ressuspensos em tampão de Laemmli 107 contendo DTT 100mM e aquecidos em água fervente por 5 minutos, foram submetidos a eletroforese gel de poliacrilamida.

(SDS-PAGE), o gel foi balizado por marcador de alto peso molecular da Bio Rad. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da BioRad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE sempre submetido a 30 volts inicialmente até a passagem pela fase de empilhamento (stacking) e 100 volts até o final do gel de resolução (resolving). A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da BioRad por 90 minutos a 120 volts. As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) por duas horas a temperatura ambiente a fim de diminuir a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana de nitrocelulose. Depois de lavadas em solução basal, estas membranas foram incubadas com anticorpos específicos, mantidas a 4°C, overnight, sob agitação contínua. Em seguida as membranas foram novamente lavadas com solução basal e as proteínas específicas foram identificadas através de anticorpos específicos e quimioluminescência em membranas de nitrocelulose. As bandas das autoradiografias foram analisadas através de densitometria óptica.

3.6 Microscopia Óptica. Após dissecação, foram fixados por imersão de formaldeído 4%, com tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por menos de 24h, sendo, então, desidratados, clareados e, por fim, embebidos em parafina. Cinco seções seriadas de 5µm de espessura foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina, a fim de se analisar a morfologia.

3.7 RT-PCR em Tempo Real. A detecção em tempo real da amplificação foi realizada em ABI 5700 Sequence Detector System (Applied Biosystems), utilizando SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Vinte ng de cada amostra de cDNA foram utilizados na reação com os primers de interesse. A expressão de *GAPDH* foi utilizada como controle endógeno das amostras e a amostra de rato controle foi usada como amostra calibradora. Para quantificação relativa de expressão gênica utilizamos a equação, 2-DDCT. O protocolo de dissociação foi

realizado no começo e no final de cada corrida para checar amplificação não específica. Foi corridas duas replicas de cada amostra na mesma placa.

3.8 Imunofluorescência. Para detectar os anticorpos de interesse, a fixação nas lâminas foi realizada em forno microondas (Panasonic Junior) a 700 w. As lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01mol/L, pH 6,0 por 10 minutos e resfriadas à temperatura ambiente. Os cortes bloqueados em BSA e incubados overnight a 4°C com o anticorpo primário. A marcação com o anticorpo secundário foi realizada utilizando-se o FITC-conjugated da Santa Cruz Inc (Santa Cruz ,CA). Os cortes foram contramarcados com DAPI.

3.9 Imunohistoquímica. Para detectar os anticorpos de interesse, a fixação nas lâminas foi realizada em forno microondas (Panasonic Junior) a 700W. As lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01mol/L, pH 6,0 por 10 minutos e resfriadas à temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram incubados overnight a 4°C com o anticorpo primário de interesse (Dako Cytomation) (diluído 1:150). Os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina do Kit LSAB+ (Dako Cytomation) por 30 minutos seguidos pela coloração com a solução cromógena de tetracloro de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich). Após a contracoloração com hematoxilinaas lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

3.10 Análise dos resultados. Os dados foram expressos como médias $\pm$ erro-padrão, sendo indicado o número de experimentos independentes. Para análise estatística, os grupos foram comparados utilizando 2-way ANOVA com o teste Bonferroni. O nível de significância adotado será de $p < 0,05$.

4. Resultados

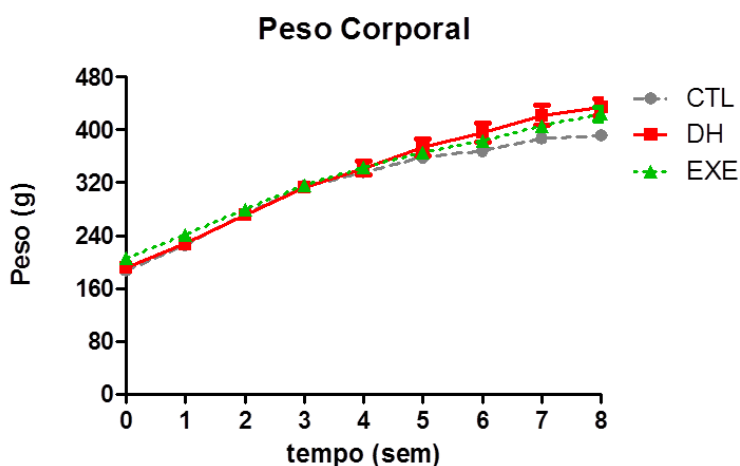
Caracterização fisiológica ao longo das 8 semanas de protocolo.

Esse protocolo foi escolhido no intuito de observar a capacidade do exercício físico aeróbico em atrasar ou ainda impedir os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica em modelo experimental. Nele utilizamos ratos *Wistar* com 6 semanas de vida, que foram divididos em 3 grupos da seguinte forma: grupo controle (CTL) composto por animais sedentários alimentados com dieta padrão para roedores, grupo dieta hiperlipídica sedentário (DH) e grupo dieta hiperlipídica treinado em natação (DH+EC).

4.1 Peso Corporal

Durante a aplicação desse protocolo, avaliamos o ganho do peso corporal dos animais estudados. Ao final do protocolo, grupo DH foi o que apresentou a maior média entre todos os grupos, e que a pratica de exercícios foi capaz de atenuar esse efeito da deita hiperlipídica, contudo não de forma significativa. Observando a Figura 1, podemos verificar que somente a partir da sexta semana o ganho de peso se tornou mais pronunciado nos animais alimentados com a dieta hiperlipídica.

Figura 1- Evolução do Peso

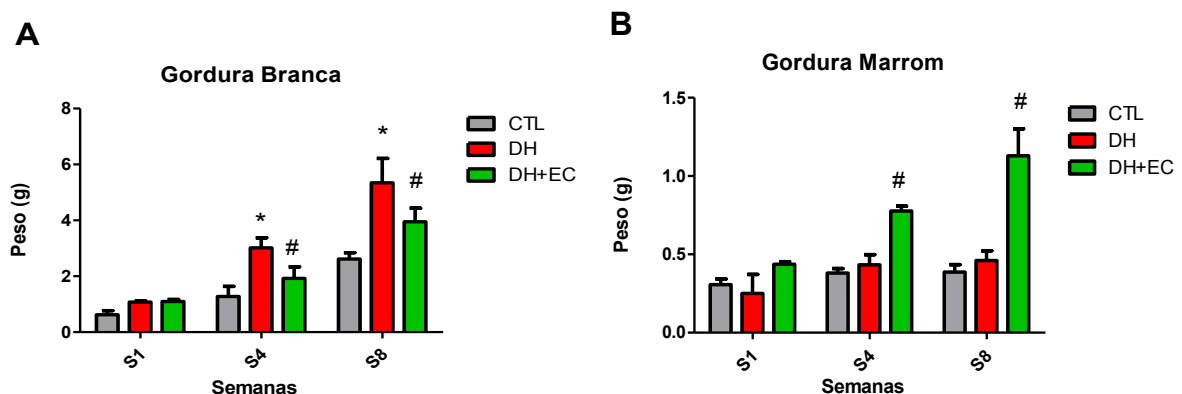


Evolução temporal do peso corporal ao longo das 8 semanas em animais CTL, DH e DH+EC. Os dados estão apresentados em $\pm$ EPM de 5 a 6 animais por grupo.

4.2. Caracterização das gorduras

Acompanhamos também o desenvolvimento do TAB ao longo das 8 semanas, utilizando para tanto as semanas 1, 4 e 8, tendo em vista que para avaliar esse parâmetro seria necessário o sacrifício dos animais. Os resultados dessa análise mostraram que todos os animais alimentados com dieta hiperlipídica, sedentários e também treinados, apresentaram depósitos de gordura epididimal maiores que os apresentados pelos animais do grupo CTL (Fig. 2A). Contudo, se compararmos os grupos DH e o DH+EC, podemos verificar que o treinamento de natação foi capaz de atenuar esse aumento, ou seja, houve diferença significativa entre os dois grupos (Fig. 2A). Em relação à gordura marrom, foco principal do desse estudo, pudemos observar que não houve qualquer diferença significativa após a primeira semana e que apenas o grupo DH+EC se mostrou significativamente maior em relação aos demais grupos nas semanas 4 e 8 (Fig. 2B).

Figura 2-. Caracterização das gorduras.

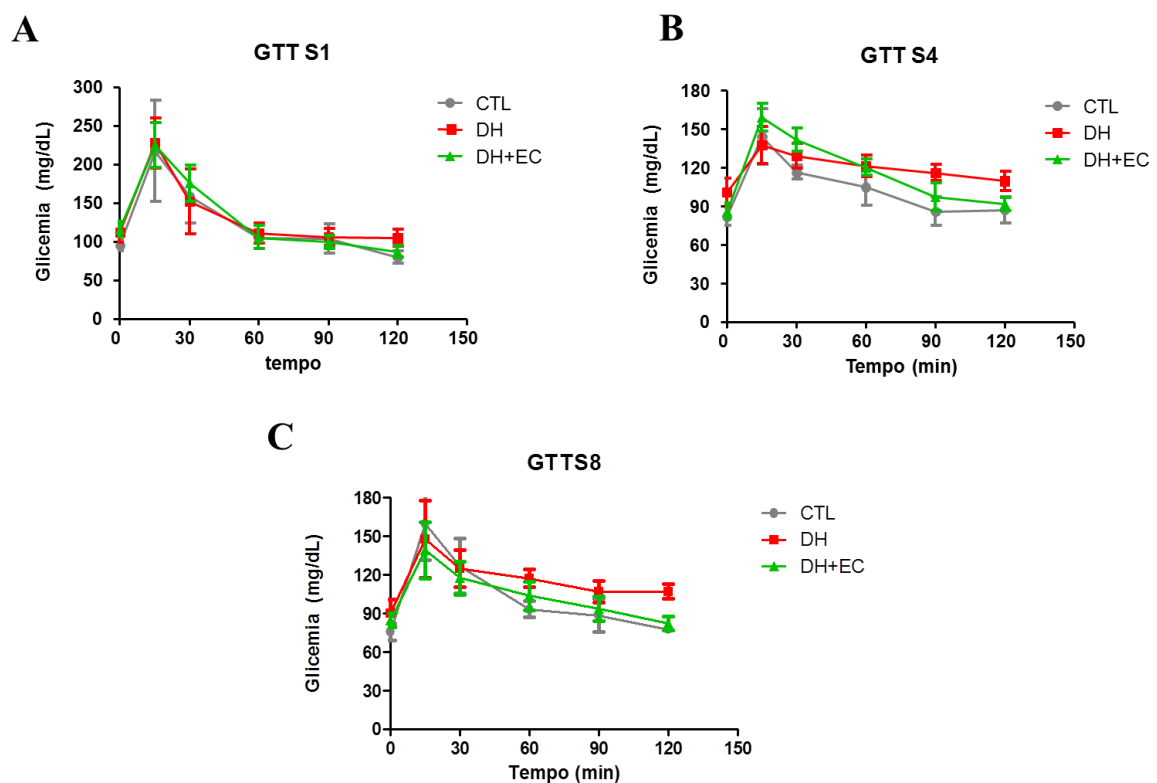


(A): Evolução temporal do tecido adiposo branco nas semanas 1,4 e 8. (B): Evolução temporal do tecido adiposo marrom interescapular absoluto nas semanas 1,4 e 8. Em animais CTL, DH e DH+EC. Os dados estão apresentados em $\pm$ EPM de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0.05$ vs. DIO, # $P < 0.05$ vs.C.

4.3. Teste de Tolerância à Glicose

Uma vez verificado o efeito da dieta e do exercício sobre o ganho de peso, iniciamos a investigação da RI através da avaliação da tolerância à glicose e também à insulina respectivamente pelo GTT e ITT. Assim como fora feito para a análise do peso dos tecidos adiposos, avaliamos as semanas 1,4 e 8. Ao longo do nosso protocolo experimental pudemos observar que o grupo DH apresentou intolerância à glicose quando comparado aos controles apenas após a quarta semana de dieta (Fig. 3A-C). Ainda em relação ao GTT, os animais do grupo DH+EC parecem apresentar alguma proteção contra o desenvolvimento da intolerância à glicose (Fig. 3A-C).

Figura 3-. Caracterização da Tolerância à Glicose.

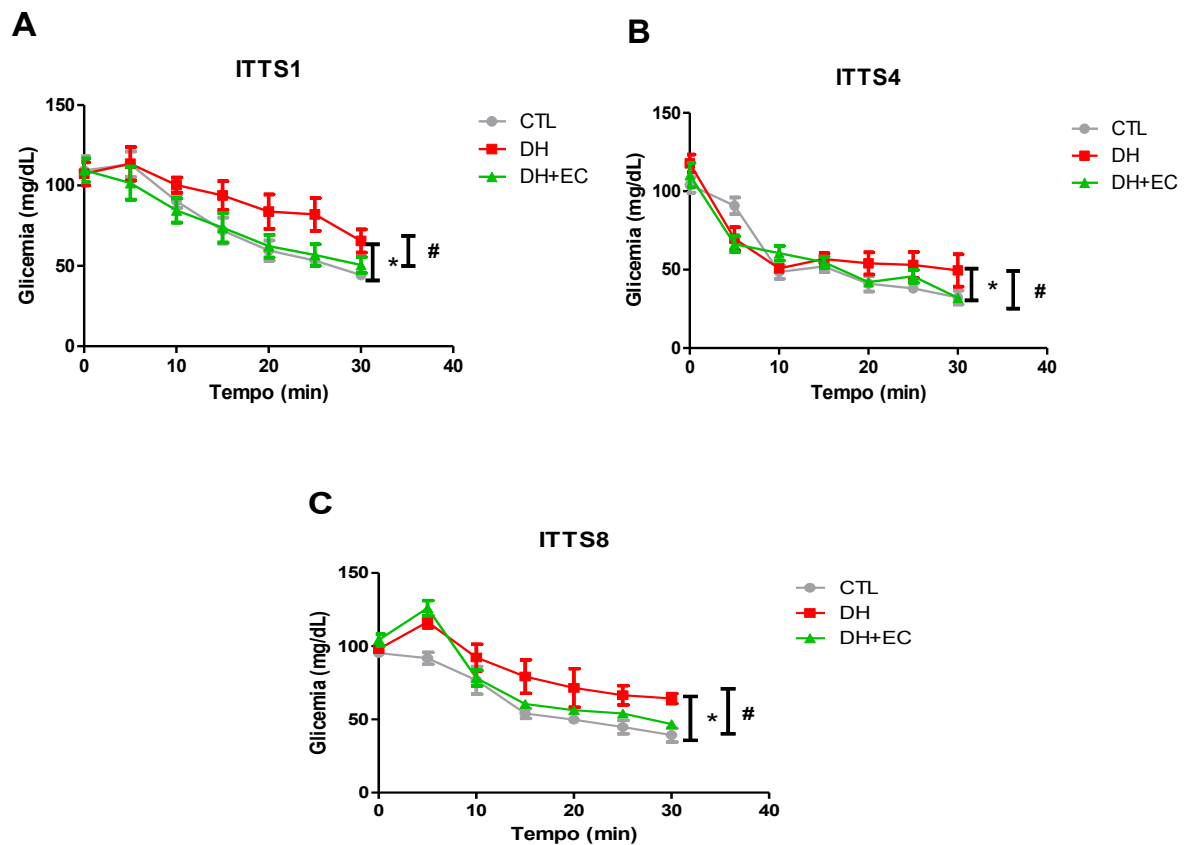


(A): Teste de tolerância à glicose ao final da semana 1. (B): Teste de tolerância à glicose ao final da semana 4. (C): Teste de tolerância à glicose ao final da semana 8. (D). Os dados estão apresentados em $\pm$ EPM de 5 a 6 animais por grupo.

4.4. Teste de Tolerância à insulina

Agora, em relação à intolerância à insulina, os resultados obtidos com os ITTs nos indicam que essa já se mostra presente mesmo após uma única semana de dieta hiperlipídica (Fig. 4A-C). Quanto ao grupo exercitado, o mesmo comportamento observado junto ao GTT ocorre também para o ITT, ou seja, o treinamento de natação iniciado concomitantemente com a dieta hiperlipídica confere proteção contra o desenvolvimento da intolerância à insulina em decorrência da dieta hiperlipídica (Fig. 4-C).

Figura 4-. Caracterização da Tolerância à Insulina.



(A): Curva de resposta da glicose durante o teste de tolerância à insulina ao final da semana 1. (B): Curva de resposta da glicose durante o teste de tolerância à insulina ao final da semana 4. (C): Curva de resposta da glicose durante o teste de tolerância à insulina ao final da semana 8. (Os dados estão apresentados em $\pm$ EPM de 4 a 5 animais por grupo).

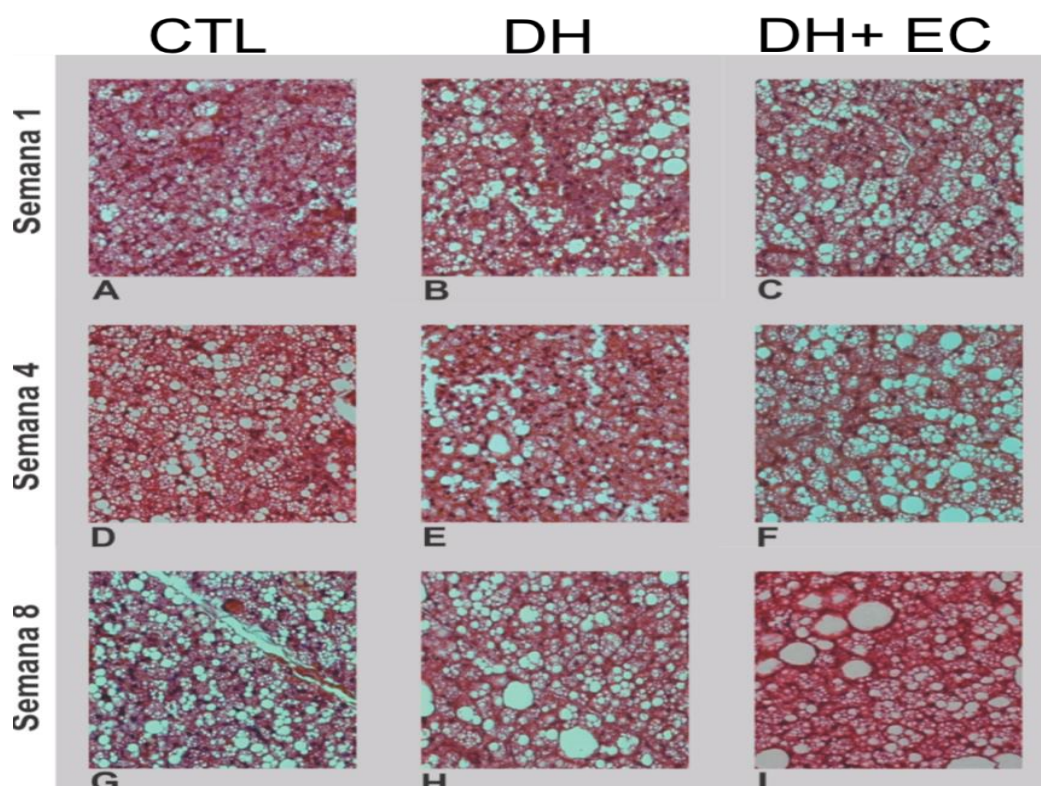
* $P < 0.05$ vs. DIO, # $P < 0.05$ vs. C.

4.5. Caracterização morfológica do tecido adiposo marrom

Após realizar a caracterização fisiológica dos animais perante o protocolo adotado, iniciamos a análise da morfologia e da infiltração de macrófagos no TAM através da utilização, respectivamente, de estudos histológicos de HE e a técnica de imunofluorescência, onde utilizamos a marcação F4/80 para macrófagos em geral (BRUCE et al., 2006 ; OLIVEIRA et al. , 2013).

Através dos estudos de histológicos pudemos observar que a dieta hiperlipídica resultou em aumento na quantidade de gordura no TAM, como evidenciado pelo aumento do número de adipócitos grandes apresentado pelos adipócitos ao longo das 8 semanas (Fig. 5A-I). Agora, em relação ao grupo DH+EC, ao contrário do esperado, o treinamento não foi capaz de prevenir o aumento do conteúdo lipídico, contudo o número de adipócitos marrom com característica de adipócito branco, ou seja, bastante hipertrofiado, se mostrou reduzido (Fig. 5A-I).

Figura 5- Caracterização morfológica do tecido adiposo marrom.

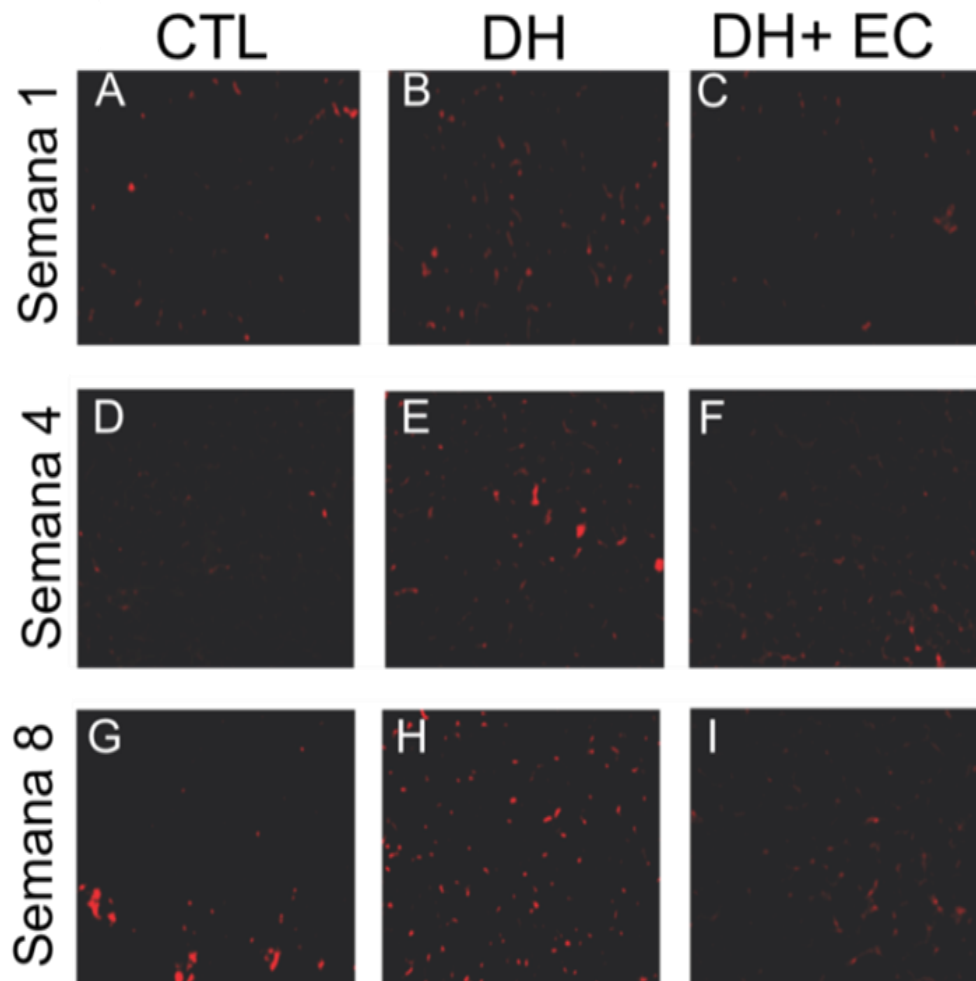


Microfotografias de marcação de HE ao final da semana 1 (A-C), semana 4 (D-F) e semana 8 (G-I). As imagens são representativas de 3 animais por grupo.

4.6. Caracterização da Infiltração de Macrófagos por Imunofluorescência.

Em relação a marcação de F4/80, um pan marcador de macrófago, pode-se observar que sua marcação aumenta de forma progressiva no grupo DH e parece estar atenuada no grupo DH+EC ao longo das semanas 1, 4 e 8 (Fig. 6A-I).

Figura 6- Caracterização da infiltração de macrófagos.

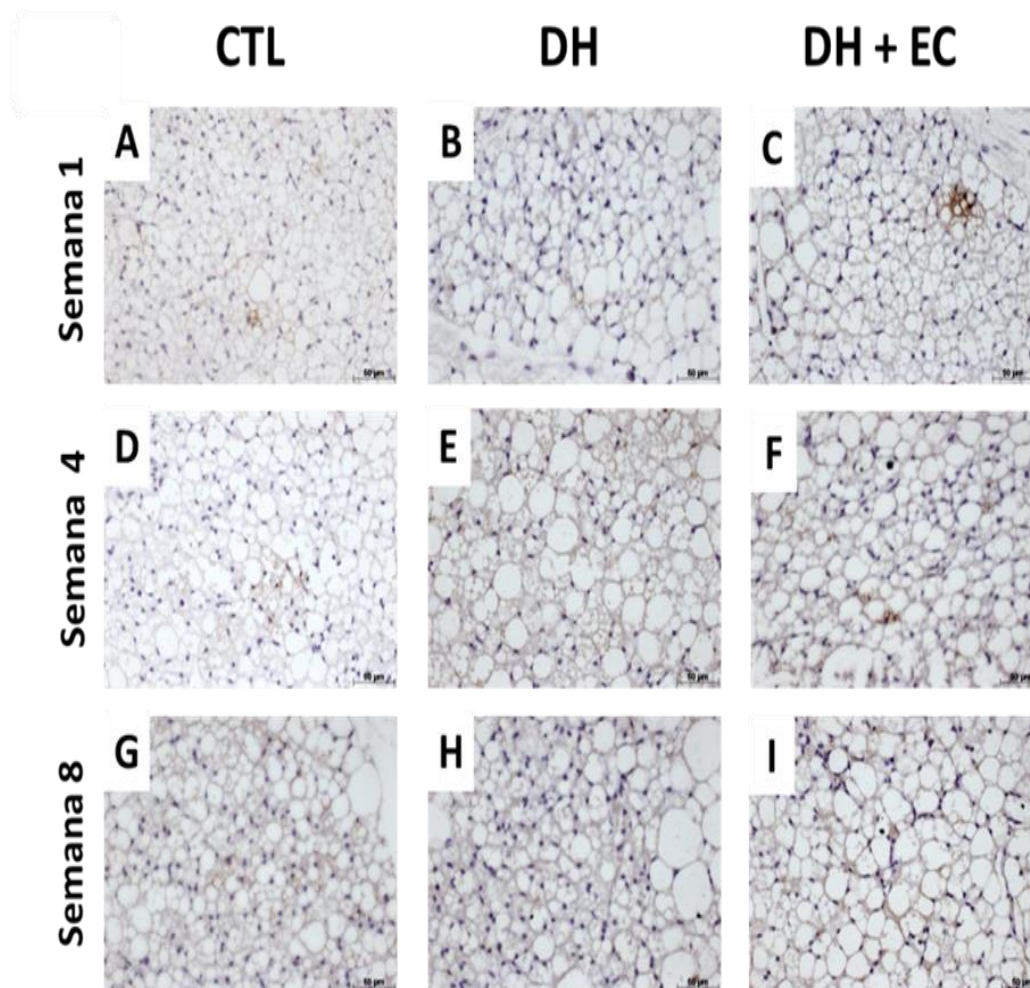


Microfotografias representativas de marcação F4/80 acompanhadas de quantificações de células positivas para F4/80 (vermelho) em TAM dos grupos CTL, DH e DH+EC ao final da semana 1 (A-C), semana 4 (D-F), semana 8 (G-I). Os dados estão apresentados em $\pm$ EPM de 3 animais por grupo. Figura 6- Caracterização da infiltração de macrófagos. Microfotografias representativas de marcação F4/80 acompanhadas de quantificações de células positivas para F4/80 (vermelho) em TAM dos grupos CTL, DH e DH+EC ao final da semana 1 (A-C), semana 4 (D-F), semana 8 (G-I). Os dados estão apresentados em $\pm$ EPM de 3 animais por grupo.

4.7. Polarização M2 de macrófagos

Uma vez verificado o efeito da dieta hiperlipídica e do exercício físico crônico de natação sobre a infiltração de macrófagos no TAM, o próximo passo consistiu na investigação dos efeitos desses dois agentes sobre a polarização M2 de macrófagos nesse tecido. Utilizando o marcador MGL-1, através da técnica de imunohistoquímica, observamos que o grupo DH apresentou redução nessa marcação, quando comparado ao grupo CTL e que o exercício realizado concomitantemente com a dieta hiperlipídica foi capaz de atenuar esse efeito negativo da dieta ao longo das 8 semanas (Fig. 7A-I).

Figura 7- Polarização M2 de macrófagos.



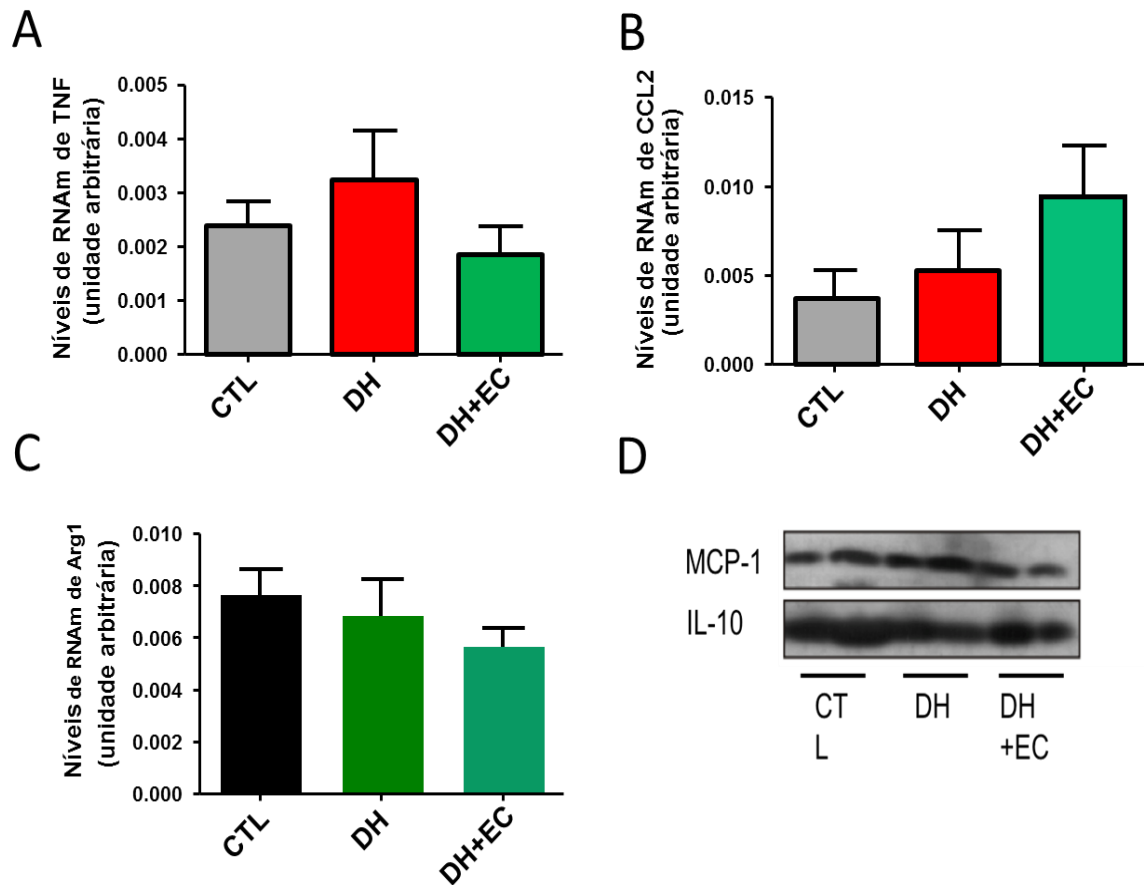
Microfotografias representativas de marcação MGL-1 através de imunohistoquímica em tecido adiposo marrom dos grupos CTL, DH e DH+EC ao final da semana 1 (A-C), semana 4 (D-F), semana 8 (G-I). Os dados estão apresentados em $\pm$ EPM de 5 animais por grupo.

4.8. Efeito da dieta e do exercício sobre citocinas

O próximo passo consistiu na avaliação da expressão de RNA mensageiro (RNAm) de TNF- α , CCL2 (MCP-1) e Arginase 1 (Arg1) ao final do protocolo do estudo, através da técnica de PCR em tempo real. Em relação á expressão de TNF- α os resultados seguiram a tendência da literatura, ou seja, estavam aumentados no grupo DH em relação ao CTL, e o exercício se mostrou eficaz em atenuar esse aumento (Fig. 8A). Para Arg1 nenhuma alteração significativa fora observada entre os grupos estudados (Fig. 8B). Já em relação aos níveis de RNAm de CCL2, gene que codifica MCP-1, os maiores níveis foram observado no grupo exercitado (Fig. 8C).

Nas análises de Western blot (Fig.8D.) , a expressão de MCP-1, referente à polarização M1, e IL-10, citocina relacionada com os macrófagos M2. Nossos resultados mostraram que 8 semanas de dieta hiperlipídica acarretam significativo aumento da MCP-1 no grupo sedentário, enquanto que nos animais que receberam dieta hiperlipídica e treinamento, de forma concomitante, tal efeito adverso foi significativamente atenuado . Agora, quando avaliamos a expressão de IL-10 verificamos que os menores valores foram encontrados no grupo DH. Já o grupo treinado apresentou proteção e o grupo CTL foi aquele que mostrou os valores mais elevados dessa citocina . Esse aumento de MCP-1 esta totalmente em acordo com os resultados observados na histologia até o momento, uma vez que essa citocina tem como principal característica atrair macrófagos para a região onde ela se encontra em abundancia. Além disso, estudo prévio lançando mão da utilização de camundongos com modelo genético de obesidade, demonstrou relação positiva entre níveis de resistência à insulina e altos níveis de MCP-1(KANDA et al., 2006). Já a manutenção dos níveis de IL-10 pode apresentar importância impar no tratamento da resistência à insulina, pois é uma potente citocina anti-inflamatória o que poderia certamente colaborar como a manutenção da sensibilidade a insulina observada nos animais exercitados.

Figura 8. Efeito da dieta e do exercício sobre citocinas.



Níveis de RNAm de TNF- α (A), CCL2 (B) e Arg1 (C) ao final da semana 8 em tecido adiposo marrom de animais CTL, DH e DH+EC. (D) Os Blots representativos mostram a expressão de MCP-1 e IL-10 ao final da semana 8 em tecido adiposo marrom de animais CTL, DH e DH+EC. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM de 3 a 4 animais por grupo.

5. Discussão

Nos últimos anos o desenvolvimento de RI tornou-se cada vez mais associado a um processo inflamatório subclínico e crônico. Nesse contexto as células imunológicas, em especial, os macrófagos, ganharam um papel de destaque visto que estes se acumulam de forma significativa no TAB durante o processo de desenvolvimento da obesidade. Mais especificamente, a polarização dessas células tornou-se um dos focos centrais na pesquisa contemporânea sobre a RI no contexto da obesidade. Nesse contexto, no presente estudo foi demonstrado que o treinamento de natação, quando iniciado ao mesmo tempo em que a dieta hiperlipídica, é capaz de promover o aumento do TAM, atenuar a infiltração de macrófagos e induzir sua polarização no sentido M2, além de prevenir o desenvolvimento da intolerância à glicose e à insulina.

Com base nos resultados de peso corporal apresentados nesse estudo, é possível observar que o exercício físico de natação não foi capaz de atenuar significativamente o ganho de peso induzido pela dieta hiperlipídica. Esse resultado se mostra particularmente importante uma vez que estudos indicam que a reduções significativas de peso corporal resultam em melhora do perfil inflamatório e também em redução na infiltração de macrófagos em tecido adiposo (CANCELLO et al.,2005,2006). Além disso, a perda de peso corporal é considerada um grande fator indutor de melhora na sensibilidade á insulina, como demonstrado em um estudo onde os indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica tiveram importante perda de peso, o que resultou em melhora na sensibilidade à insulina (ANDERWALD et al.,2012).

Os resultados do peso do TAB e TAM nos indicam que todos os animais alimentados com dieta hiperlipídica, sejam eles sedentários ou treinados, apresentaram depósitos de gordura epididimal maiores que os apresentados pelos animais do grupo CTL. No entanto, quando levamos em consideração apenas os animais em dieta hiperlipídica, pudemos verificar que o treinamento de natação foi capaz de atenuar de forma significativa esse aumento. Esse resultado indica que o treinamento apesar de não atenuar o ganho de peso, ele foi sim capaz de promover melhora na composição corporal desses animais. Essa redução do conteúdo de gordura epididimal pode ter contribuído com efeito positivo do treinamento sobre a

RI. Em acordo com essa hipótese, em um estudo prévio fora demonstrado que reduções na adiposidade resultavam em melhora na ação da insulina em indivíduos com sobrepeso e também naqueles com obesidade já estabelecida (WEISS; REEDS; EZEKIEL et al., 2016). Em relação ao peso do TAM, nosso estudo constatou que o grupo DH+EC obteve um aumento significativo de TAM nas semanas 4 e 8, ressaltando que essa diferença se dá tanto em termos absolutos, quanto relativamente ao peso corporal desses animais. Esse aumento do TAM pode também contribuir para esse efeito profilático do exercício sobre a RI tendo em vista que esse tecido vem sendo considerado um protetor contra o desenvolvimento de RI em consequência da dieta hiperlipídica (HAMMAN; FLIER; LOWELL, 1996). Agora, quando analisamos em conjunto, esses achados de gordura branca e marrom, podemos verificar a presença de um papel protetor do exercício físico crônico de natação sobre a composição corporal ante a dieta hiperlipídica administrada de forma isolada, uma vez que ele parece direcionar o acúmulo de gordura para o TAM em detrimento do TAB. Além disso, esse incremento absoluto na massa do TAM se faz particularmente importante quando levamos em consideração as evidências de que esse tipo de tecido pode proteger contra o desenvolvimento da obesidade, entre outros aspectos por ser responsável por um incremento significativo de gasto calórico diário (ROTHWELL, 1983 ;SLOCUM et al., 2013). Estudos subsequentes se fazem necessários para esclarecer melhor os mecanismos intrínsecos do desenvolvimento do TAM como consequência do treinamento de natação.

Analisando esses fatores simultaneamente com os resultados de GTT e ITT, é possível observar que o treinamento físico iniciado concomitantemente com a dieta hiperlipídica foi capaz de prevenir o acometimento de RI ao grupo. O que está em total acordo com um estudo anterior no qual foi demonstrado que a prática de exercícios era capaz de atenuar os efeitos negativos da dieta hiperlipídica na sensibilidade à insulina (RAO; ZHONG; XU; et al. ,2013). Outro estudo lança o exercício físico combinado, aeróbico e resistido, como uma terapia importante para diabetes mellitus tipo 2, devido, entre outros aspectos, por aumentar a absorção de glicose em decorrência de sensibilidade á insulina melhorada, além de aumentar a ativação de grandes músculos, o que tem como consequência estimular importante quantidade de captação de glicose, ou seja, em outras palavras, esse tipo de treinamento melhora transporte de glicose o que resulta em aumento na tolerância à glicose (HARRISON et al., 2016). Contudo, mais estudos se fazem necessários para

elucidar o quão duradora pode ser essa proteção, bem como qual a menor intensidade e volume semanal que o exercício físico deve ter para alcançar esses resultados benéficos contra a alimentação rica em gordura saturada.

Em relação ao acúmulo de gordura no TAM o contrário do esperado, nosso estudo evidencia que o exercício físico não foi capaz de prevenir o aumento do conteúdo lipídico dentro das células, ou seja, o que pode nos indicar que exercício aeróbico crônico promove um aumento no TAM também por hipertrofia, assim como acontece com o aumento do TAB em decorrência da dieta hiperlipídica. Além disso, podemos levantar a hipótese de que esse maior acúmulo de gordura em cada adipócito marrom poderia ter como função fornecer um combustível rápido para ser oxidado por essas células no processo de termogênese, devido ao potencial metabólico desse tecido. Levando essa hipótese em consideração, um próximo passo interessante, para elucidar essa hipótese, seria avaliar o conteúdo mitocondrial do TAM desses animais submetidos ao treinamento.

Nos resultados de infiltração de macrófagos, o pan marcador de macrófago F4/80 ,que marca tanto macrófagos da ativação clássica como macrófagos da ativação alternativa, nos permitiu verificar que a infiltração de macrófagos no animais do grupo DH se deu de forma progressiva ,enquanto no grupo DH+EC a marcação para F4/80 mostra-se atenuada nas três semanas observadas, ou seja, após a primeira, quarta e oitava semana. Esse comportamento se mostra bastante similar ao observado em estudo anterior, onde fora verificado que o treinamento de corrida promovia redução na infiltração de macrófagos no TAB de animais alimentados com dieta hiperlipídica (KAWANISHI et al.,2010). Contudo, vale mencionar que nosso protocolo é diferente, uma vez que utilizamos o exercício como profilaxia e não como tratamento. Outro estudo (SILVEIRA et al., 2016) apresenta uma conclusão que esta em acordo com os nossos resultados, o que ressalta o efeito benéfico do exercício sobre e infiltração de macrófagos, o estudo afirma que o exercício crônico parece inibir a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, como evidenciado pela atenuação da expressão de F4/80 nesse tecido. Assim, mais estudos devem ser realizados no intuito de avaliar por quanto tempo o exercício é capaz de evitar esse efeito negativo da dieta hiperlipídica, uma vez que a infiltração de macrófagos parece ser um ponto importante no desenvolvimento da RI em decorrência da obesidade.

Quanto ao efeito retratado na polarização de macrófagos M2, em que o grupo DH apresentou redução na marcação de MGL-1, o exercício realizado concomitantemente com a dieta hiperlipídica foi capaz de atenuar esse efeito negativo da dieta ao longo das 8 semanas, ou seja, ele resultou em manutenção do balanço M2/M1, o que possui extrema importância uma vez que termogênese do TAM parece depender da ativação M2 (NGUYEN et al., 2011), logo podemos supor que o TAM de animais treinado deve possuir maior atividade que os de animais sedentários em dieta hiperlipídica. Um estudo recente, indica que a mudança na polarização de macrófagos varia de acordo com a diversidade de citocinas presentes no microambiente ou pelos estímulos de algum antígeno, alternando dessa forma o fenótipo dos macrófagos, o que pode auxiliar a atenuar o desenvolvimento de uma doença inflamatória (SILVEIRA et al., 2016).

Os resultados de RNAm, primeiramente relacionados à citocina pró-inflamatória $TNF-\alpha$, apresenta-se totalmente de acordo com a literatura, visto que o seu maior aumento foi no grupo DH como esperado, já que a dieta hiperlipídica induz maior polarização da ativação M1 e liberação de citocinas pró-inflamatórias, porém os resultados ARG1 e MCP-1, a princípio nos apareceram um tanto quanto estranhos, uma vez que fogem um pouco do observado na literatura. Assim algumas hipóteses podem ser levantadas. Primeiramente, esses resultados podem simplesmente não representar os grupos analisados uma vez que o n experimental é de 3 ou 4 animais por grupo para esses experimentos. Outra possibilidade está relacionada ao fato dos níveis de RNAm muitas vezes não acompanhar a quantidade de proteína expressa, uma vez que ele pode estar reduzido ou aumentado respectivamente em resposta a um aumento ou redução na quantidade da proteína já expressa. Nessa linha, quando avaliamos, através de *Western blot*, a expressão de MCP-1, referente à polarização M1, e IL-10, citocina relacionada com os macrófagos M2, nossos resultados mostraram que ao final das 8 semanas de protocolo o exercício físico crônico foi capaz de atenuar a expressão de MCP-1, e promover importante aumento na expressão proteica de IL-10. Essa redução de MCP-1 está totalmente em acordo com os resultados observados na histologia, uma vez que essa citocina tem como principal característica atrair macrófagos para a região onde ela se encontra em abundância, resultando entre outras coisas em resistência à insulina (MRAZ; HALUZIK, 2014). Além disso, estudo prévio lançando mão da utilização de camundongos com modelo genético de obesidade, demonstrou

relação positiva entre níveis de RI e altos níveis de MCP-1 (KANDA et al.,2006). Já a manutenção dos níveis de IL-10 pode apresentar importância ímpar no tratamento da resistência à insulina, pois é uma potente citocina anti-inflamatória o que poderia certamente colaborar como a manutenção da sensibilidade à insulina observada nos animais exercitados.

Com base nos resultados apresentados e seu confronto com a literatura, é possível verificar um forte papel profilático do exercício físico contra os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica, com especial destaque para o seu componente anti-inflamatório.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo nos permitem fazer algumas conclusões. Primeiramente, o exercício foi capaz direcionar o conteúdo lipídico da dieta para o TAM em detrimento do TAB. Além disso, com o efeito anti-inflamatório do exercício físico foi possível notar com a atenuação da infiltração de macrófagos, bem como a manutenção da polarização M2, acompanhada de redução no RNAm de TNF- α e aumento na expressão proteica de IL-10. Porém como o n experimental fora muitas vezes de certa forma reduzido, ainda são necessários mais estudos para confirmar a extensão do efeito protetor do exercício sobre a ingestão de dietas ricas em gordura saturada.

REFERÊNCIAS

- ANDERWALD, C. H. et al. Alterations in gastrointestinal, endocrine, and metabolic processes after bariatric Roux-en-Y gastric bypass surgery. **Diabetes Care**, v. 35, n. 12, p. 2580-7, Dec 2012.
- BAI, Y.; SUN, Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. **Obes Rev**, v. 16, n. 2, p. 127-36, Feb 2015.
- BRADLEY, R. L. et al. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, n. 3, p. E586-94, Sep 2008.
- Bruce, C.R., et al., Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 1, p. E99-E107, Jul 2006.
- BRUUN, J. M. et al. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 5, p. E961-7, May 2006.
- CANCELLO, R. et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1554-61, Jun 2006.
- CANCELLO, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277-86, Aug 2005.
- DANDONA, P. et al. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, n. 8, p. 2907-10, Aug 1998.
- FAIN, J. N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273-82, May 2004.
- FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, n. 5, p. 911-9; quiz 920, May 2005.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003.
- GORDON, S. and P.R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, p. 953-64, Dez 2005.
- GREIWE, J. S. et al. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor alpha in frail elderly humans. **FASEB J**, v. 15, n. 2, p. 475-82, Feb 2001.

HAMANN, A.; FLIER, J. S.; LOWELL, B. B. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 21-9, Jan 1996.

HARRISON, A. L. et al. Exercise improves glycaemic control in women diagnosed with gestational diabetes mellitus: a systematic review. **J Physiother**, Aug 22 2016.

HENRICHOT, E. et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 12, p. 2594-9, Dec 2005.

HERRERO, L. et al. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 1, p. 240-5, Jan 5 2010.

HEVENER, A. L. et al. Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. **J Clin Invest**, v. 117, n. 6, p. 1658-69, Jun 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-7, Dec 14 2006.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 4, p. 473-81, Aug 2000. ISSN 0021-9738

KAMEI, N. et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **J Biol Chem**, v. 281, n. 36, p. 26602-14, Sep 8 2006.

KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**, v. 116, n. 6, p. 1494-505, Jun 2006.

KASAPIS, C.; THOMPSON, P. D. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. **J Am Coll Cardiol**, v. 45, n. 10, p. 1563-9, May 17 2005.

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

LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur J Endocrinol**, v. 147, n. 1, p. 149-57, Jul 2002.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175-84, Jan 2007.

LUMENG, C. N. et al. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3239-46, Dec 2008.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Front Biosci**, v. 13, p. 453-61, 2008.

MORRIS, D. L.; SINGER, K.; LUMENG, C. N. Adipose tissue macrophages: phenotypic plasticity and diversity in lean and obese states. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 14, n. 4, p. 341-6, Jul 2010.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **J Endocrinol**, v. 222, n. 3, p. R113-27, Sep 2014

NEDERGAARD, J. et al. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. **Biochim Biophys Acta**, v. 1504, n. 1, p. 82-106, Mar 1 2001.

NGUYEN, K. D. et al. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. **Nature**, Nov 20 2011.

ODEGAARD, J. I. et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116-20, Jun 28 2007.

OLIVEIRA, A. G. et al. Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 12, p. 2545-56, Dec 2013.

OLIVEIRA, A. G. . **EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO AGUDO E CRÔNICO NA EXPRESSÃO E ATIVAÇÃO DO TLR4 EM ROEDORES**. 2012. 60 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Médicas, Clínica Médica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em: <<http://pct.capes.gov.br/teses/2012/33003017065P0/TES.PDF>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

2012.PATSOURIS, D. et al. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. **Cell Metab**, v. 8, n. 4, p. 301-9, Oct 2008.

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

PICKUP, J. C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 3, p. 813-23, Mar 2004.

PICKUP, J. C.; CROOK, M. A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia**, v. 41, n. 10, p. 1241-8, Oct 1998.

Rao X, Zhong J, Xu X, Jordan B, Maurya S, Braunstein Z, et al. Exercise Protects against Diet Induced Insulin Resistance through Downregulation of Protein Kinase C β in Mice. **PLoS ONE** 2013

- ROPELLE, E. R. et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **J Physiol**, v. 577, n. Pt 3, p. 997-1007, Dec 15 2006.
- SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J Clin Invest**, v. 118, n. 9, p. 2992-3002, Sep 2008.
- SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-80, May 2007.
- SILVEIRA, L. S. et al. Macrophage Polarization: Implications on Metabolic Diseases and the Role of Exercise. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 26, n. 2, p. 115-32, 2016.
- SLOCUM, N. et al. Responses of brown adipose tissue to diet-induced obesity, exercise, dietary restriction and ephedrine treatment. **Exp Toxicol Pathol**, v. 65, n. 5, p. 549-57, Jul 2013.
- SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S. Obesity and the regulation of energy balance. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 531-43, Feb 23 2001.
- SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **J Leukoc Biol**, v. 88, n. 1, p. 33-9, Jul 2010.
- UYSAL, K. T. et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 610-4, Oct 9 1997.
- WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1111-9, May 2005.
- WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1785-8, Dec 2003.
- WEISBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **J Clin Invest**, v. 116, n. 1, p. 115-24, Jan 2006.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, Dec 2003.
- .WEISS,E.P; REEDS,D.N ;EZEKIEL,U.R,et al. Circulating cytokines as determinants of weight loss-induced improvements in insulin sensitivity.**Endocrine**, Sep 7 2016.
- YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. **Nat Med**, v. 7, n. 8, p. 941-6, Aug 2001.
- YOUNG, J. B. et al. Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat. **J Clin Invest**, v. 69, n. 5, p. 1061-71, May 1982.
- YUDKIN, J. S.; ERINGA, E.; STEHOUWER, C. D. "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. **Lancet**, v. 365, n. 9473, p. 1817-20, May 21-27 2005.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1821-30, Dec 2003

GLOSSÁRIO

ARg1 - Arginase 1.

CCL2 - Gene que codifica a citocina MCP-1.

CTL – Controle.

DH - Dieta Hiperlipídica.

DH+EC - Dieta Hiperlipica + Exercício Físico.

F4/80 - Marcador de Macrófagos.

GTT - Teste de tolerância á glicose.

IL-10 - Interleucina 10.

iNOS: óxido nítrico-sintase induzida.

ITT - Teste de tolerância á insulina.

LPS – Lipopolissacarídeo.

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1.

MGL-1- Marcador de Macrófagos M2.

M1- Macrófagos ativação clássica.

M2 - Macrófagos ativação alternativa.

RI - Resistência á Insulina.

RNAm - RNA mensageiro.

TAB - Tecido Adiposo Branco.

TAM - Tecida Adiposo Marrom.

TNF- α - Fator necrose tumoral.