
EDUCAÇÃO FÍSICA

IGOR ALEXANDRE DOMINGUES

**EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO NA
QUANTIDADE E NA POLARIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE
KUPFFER EM RATOS WISTAR.**



Rio Claro
2018

Igor Alexandre Domingues

EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBICO NA
QUANTIDADE E NA POLARIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE
KUPFFER EM RATOS WISTAR.

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” - Câmpus de Rio Claro,
para obtenção do grau de Bacharel em
Educação Física.

Rio Claro

2018

617.1027 Domingues, Igor Alexandre
D671e Efeitos do treinamento aeróbico na quantidade e na polarização das
células de Kupffer em ratos Wistar. / Igor Alexandre Domingues. - Rio
Claro, 2018
38 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 tecido
hepático.. 4. Tecido hepático. I. Título.

Dedico este trabalho à minha família, amigos e a meu orientador por tornarem esses anos de faculdade inesquecíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por terem estado ao meu lado em todas as horas e por terem ajudado tornar esse sonho possível. Aos velhos amigos que se mantiveram presentes após longos anos, aos novos amigos de faculdade e aos que fizeram parte da “turma 3”, os quais levarei por toda vida. À minha namorada Amarylis, que me apoiou e ajudou na fase final desta faculdade.

Agradeço também ao meu orientador Alexandre Gabarra de Oliveira por acreditar em mim, aos amigos de laboratório Carolina Pasqual, Isabela Preto, Wellington Kyuski e aos técnicos de laboratório China, Beto e Clarice Kokobun.

Agradeço ao 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.

Por final, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram nesses poucos e bons anos de faculdade.

RESUMO

Os macrófagos, células imunológicas, podem ser classificados quanto a sua ativação em M1 (ativação clássica), sendo capaz de produzir citocinas pró-inflamatórias em resposta a estímulos inflamatórios, ou no modelo de polarização M2 (anti-inflamatória/alternativa) que é ativado segundo influência das citocinas TH2 (IL-4 e IL-13). Essas células podem se acumular no tecido hepático em quadros de obesidade, sendo já evidenciado que uma dieta rica em lipídeos é capaz de promover a polarização de macrófagos de M2 para M1, favorecendo a patogenicidade da resistência à insulina. Assim, a ativação inflamatória dos macrófagos residentes do tecido hepático (células de Kupffer), vem se relacionando com a resistência à insulina induzida pela obesidade, bem como com a doença hepática gordurosa não-alcoólica. Estudos mostraram que o exercício físico com intensidade de leve a moderada, é capaz de reduzir a inflamação no fígado e consequentemente a sensibilidade à insulina na obesidade animal. Este estudo teve como objetivos investigar o efeito da natação na infiltração e no balanço da polarização de macrófagos no tecido hepático em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, divididos em 3 grupos: animais controle (CTL) alimentados com dieta padrão, para roedores alimentados com dieta hiperlipídica (DH) e animais exercitados cronicamente (4 a 8 semanas) e alimentados com dieta hiperlipídica (DH+EC). Para avaliação da infiltração e polarização de macrófagos utilizamos as técnicas de immunoblotting, análise de RNAm e também estudos histológicos (imunohistoquímica e imunofluorescência). Também foram realizados testes de tolerância à glicose e à insulina. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro-padrão e para análise estatística foi feita análise de variância (ANOVA) e pós-teste Bonferroni. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os animais dos grupos DH e DH+EC apresentaram peso corporal significativamente superiores comparados aos do grupo CTL, mas não houve diferença significativa entre os dois primeiros, logo, os efeitos observados no tecido hepático se deram em consequência do treinamento de natação. O grupo DH mostrou maior

intolerância à insulina e à glicose comparado aos congêneres em dieta padrão, ou seja, o protocolo de exercício melhorou a sensibilidade à insulina e retrocedeu o efeito negativo da dieta hiperlipídica, reduzindo de forma significativa o conteúdo de macrófagos M1 no tecido hepático e favorecendo a polarização M2.

Palavras-Chaves: Resistência à insulina, macrófagos, tecido hepático.

ABSTRACT

Macrophages, immunological cells, can be classified according to their activation as M1 (classical activation), being able to produce proinflammatory cytokines in response to inflammatory stimuli, or as M2 (anti-inflammatory/alternative) polarization model that is activated influence of TH2 cytokines (IL-4 and IL-13). These cells can accumulate in the hepatic tissue during obesity, and it has been shown that a diet rich in lipids can promote the polarization of macrophages from M2 to M1, favoring the pathogenesis of insulin resistance. Thus, inflammatory activation of resident macrophages of hepatic tissue (Kupffer cells) has been associated with obesity-induced insulin resistance, as well as on non-alcoholic fatty liver disease. Studies have shown that physical exercise with mild to moderate intensity is able to reduce inflammation in the liver and consequently the insulin sensitivity in animal obesity. This study aimed to investigate the effect of swimming on the infiltration and balance of macrophages polarization in hepatic tissue in animals fed with hyperlipidic diet. Male Wistar rats were divided into three groups: control animals (CTL) fed with standard diet, animals fed with hyperlipid diet (DH) and animals exercised chronically (4 to 8 weeks) and fed with a hyperlipid diet (DH+EC). In order to evaluate the infiltration and polarization of macrophages we used the techniques of immunoblotting, mRNA analysis and also histological studies (immunohistochemistry and immunofluorescence). Glucose and insulin tolerance tests have also been performed. Data were expressed as mean $\pm$ standard error and for statistical analysis, analysis of variance (ANOVA) and post-test Bonferroni were performed. The level of significance was set at $p < 0.05$. The animals of the DH and DH+EC groups had significantly higher body weight compared to the CTL group, but there was no significant difference between the first two, so the effects observed in the hepatic tissue occurred as a consequence of swimming training. The DH group showed greater insulin and glucose intolerance compared to the congenères in a standard diet, in other words, the exercise protocol improved insulin sensitivity and reversed the

negative effect of the hyperlipid diet, significantly reducing the content of M1 macrophages in the tissue hepatic and favoring M2 polarization.

Key words: Insulin resistance, macrophages, hepatic tissue.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivos Gerais	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3.	MATERIAS E MÉTODOS	17
3.1	Anticorpos e Reagentes	17
3.2	Animais e dieta	17
3.3	Programa de treinamento físico crônico	17
3.4	Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT)	17
3.5	Verificação da glicemia e Teste de tolerância	18
	intraperitoneal à glicose (GTT).....	18
3.6	Extração de Tecidos.....	18
3.8	Imunoistoquímica.....	19
3.9	Imunofluorescência	19
3.10	Análise dos resultados	19
4.	RESULTADOS	20
4.1	Peso Corporal.....	20
4.2	Sensibilidade à insulina e à glicose	21
4.3	Caracterização da infiltração de Macrófagos M1	22
4.4	Polarização M2 de Macrófagos.....	23
5.	DISCUSSÃO.....	25
6.	CONCLUSÃO	28
7.	REFERÊNCIAS	29
8.	GLOSÁRIO.....	37

1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório sub-clínico e crônico tem se mostrado um dos mecanismos mais relevantes para o desenvolvimento de quadros de resistência à insulina (RI) nos tecidos alvo desse hormônio, entre outros aspectos, através da elevação da expressão de citocinas pró-inflamatórias como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1). Essas citocinas que podem comprometer a sinalização fisiológica da insulina em seus tecidos-alvo como por exemplo, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo branco (KAHN; FLIER, 2000; PICKUP, 2004; PICKUP; CROOK, 1998; YAMAUCHI et al., 2001).

Recentemente, houve um crescente interesse sobre o papel de células do sistema imune, principalmente dos macrófagos, visto que estes podem se acumular no tecido adiposo e no fígado no decorrer do desenvolvimento de quadros de obesidade e também por apresentarem forte relação com os parâmetros de RI (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008; SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007; WEISBERG et al., 2003). Tal fenômeno fora muito bem demonstrado tanto em modelos animais de obesidade quanto em humanos obesos (SCHULZ et al., 2012).

O conteúdo de macrófagos no tecido adiposo branco (TAB) de animais magros corresponde a cerca de 10% do total de células nesse tecido, ao passo que em animais obesos a fatia de macrófagos chega a ocupar até 40% do conteúdo celular no TAB (WEISBERG et al., 2003). Um estudo demonstrou que esse aumento de macrófagos revelava importância ímpar no desenvolvimento da RI, uma vez que estratégias genéticas ou farmacológicas de inibição da infiltração de macrófagos promovia importante redução da inflamação juntamente com uma melhora na sensibilidade à insulina (SUGANAMI; OGAWA, 2010).

Além disso, a redução do peso corporal, quer por estratégias dietéticas ou aumento da atividade física, está associada com diminuição tanto da inflamação quanto da quantidade de macrófagos presentes no TAB, reforçando ainda mais a proporcionalidade entre obesidade e a infiltração de macrófagos (CANCELLO et al., 2005, 2006). Ainda, cerca de 90% de todo

conteúdo de macrófagos presentes em tecido de animais obesos se encontram formando estruturas “crown-like” em volta de adipócitos, ou seja, se arranjam como coroas em volta dos adipócitos que sofreram apoptose ou que estão em vias de, nesses locais essas células imunológicas auxiliam no remodelamento do tecido que encontra-se em constante expansão, proporcionando aumento da angiogêneses, entre outros aspectos (CINTI et al., 2005; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; PHIPPS et al., 2015).

Os macrófagos, células especializadas em fagocitar, podem ser encontrados na maioria dos tecidos do organismo atuando principalmente como iniciadores e efetores do sistema imune inato, e assim regulam a resposta inflamatória em diversas doenças (DÖRGER et al., [s.d.]; HELD et al., 1999; KOMOHARA et al., 2016; TOSELLO-TRAMPONT et al., 2012; WIKTOR-JEDRZEJCZAK et al., 1996). Originam-se dos monócitos provenientes, principalmente, da medula óssea que migram para os tecidos onde se diferenciam nos macrófagos tecido-específicos (CAILHIER et al., 2005; GORDON; TAYLOR, 2005; NAITO et al., 1996). Ao contrário de outras células mielóides, como os neutrófilos, que possuem vida de cerca de poucos dias, ou seja, relativamente curta, os macrófagos podem viver por alguns meses nos tecidos, o que certamente corrobora com seu papel relevante no desenvolvimento da RI (SICA et al., 2015).

Uma das características particulares dos macrófagos consiste na grande heterogeneidade que eles podem apresentar em virtude do ambiente em que se encontram. Eles podem proteger a integridade do tecido em que se encontram, além de promover a reparação tecidual; ou em contrapartida, no contexto da inflamação crônica, podem ser responsáveis por induzir destruição tecidual graças a sua potente produção de citocinas pró-inflamatórias e enzimas proteolíticas, além de participar na proliferação e disseminação de células cancerígenas (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013; GORDON; TAYLOR, 2005).

Por conseguinte, pode-se postular que os macrófagos apresentam vasta plasticidade, já que podem apresentar diferentes funções, morfologia e propriedades fenotípicas, em conformidade com o ambiente local onde se encontram (GORDON; TAYLOR, 2005; NAITO et al., 1996). Como supramencionado, a infiltração de macrófagos, em consequência do

ganho de peso, parece ser um dos componentes chaves na progressão da RI (HOTAMISLIGIL, 2006; LUMENG et al., 2008). Todavia, nem todo macrófago possui fenótipo inflamatório (LUMENG et al., 2008). Os sinais presentes nos diferentes microambientes em virtude da presença de patógenos, lesão tecidual ou ainda em decorrência das atividades de efetores do sistema imune inato promovem programações genéticas bastante heterogêneas na diferenciação dos macrófagos, resultando assim em diferentes estados de polarização, ou ativação.

Nesse contexto, o atual paradigma descreve a atividade dos macrófagos em dois grandes subtipos: macrófagos M1, ou macrófago classicamente ativados, e macrófagos M2, ou macrófagos ativados alternativamente. No entanto, é importante mencionar que esses dois fenótipos de polarização levam em conta apenas os dois extremos de um espectro extremamente amplo de estados funcionais que este tipo celular pode desempenhar em acordo com o ambiente ou situação em que se encontra (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005; MARTINEZ et al., 2008; MURRAY et al., 2014).

Os macrófagos M1, de ativação clássica, apresentam atividade antimicrobiana através da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL12, entre outros, além da produção de outras moléculas da resposta inflamatória como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, em resposta a estímulos inflamatórios como lipolissacarídeo (LPS) e interferon- γ (NAITO et al., 1996). Apesar disto, quando plenamente ativados na polarização M1, os macrófagos apresentam atividade antitumoral (MURRAY et al., 2014).

Enquanto que a influência das citocinas TH2 (IL-4 e IL-13) promovem ativação M2, denominada anti-inflamatória ou alternativa (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; MARTINEZ et al., 2008). Essa polarização é de fundamental importância para a respostas TH2, resultando na resolução da inflamação bem como na reparação tecidual necessária após os efeitos promovidos pela atividade M1 (NOVAK; KOH, 2013; SICA; MANTOVANI, 2012).

Evidências retratam que a dieta hiperlipídica promove a polarização dos macrófagos residentes do tecido adiposo branco de M2 para M1 (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007), o que acarreta em aumento da secreção de citocinas inflamatórias, e que certamente contribui para a patogênese da RI (GORDON, 2003; GORDON; TAYLOR, 2005; MANTOVANI et al., 2004).

Nessas circunstâncias, fica claro que na obesidade podemos encontrar além de grande infiltração de macrófagos, também a acentuada polarização no sentido M1, resultando em inflamação crônica e sistêmica (metainflamação), indicando assim o papel de destaque dos macrófagos no decurso da obesidade e de suas comorbidades associadas como RI, diabetes e doenças cardiovasculares, doenças essas com conhecida associação com processos inflamatórios (GRANT; DIXIT, 2015).

As citocinas inflamatórias produzidas pelos macrófagos M1 (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) atrapalham a ação fisiológica da insulina, contribuindo assim para o aumento da resistência à ação desse hormônio em seus tecidos-alvo (WEISBERG et al., 2003, 2006; XU et al., 2003). Em contrapartida, estudos indicam que os animais magros apresentam predominância de macrófagos M2 (GORDON, 2003; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; MANTOVANI et al., 2004). Os macrófagos M2 parecem apresentar menor acúmulo de gordura durante a obesidade (ANTHONY et al., 2007). Outra diferença importante é decorrente da velocidade de recrutamento, onde estudos demonstraram que os macrófagos anti-inflamatórios (M2) apresentam velocidade reduzida quando comparados aos M1 (LUMENG et al., 2008; SHAUL et al., 2010).

A importância da relação entre macrófagos M1 e M2 para o metabolismo da glicose foi demonstrada em um apurado estudo, no qual camundongos com deficiência para ativação do tipo M2 apresentaram aumento na inflamação e agravando o grau de RI (HEVENER et al., 2007; ODEGAARD et al., 2007). Foi também demonstrada recuperação da sensibilidade à insulina através da redução das células positivas CD11c ou anulação de alguns marcadores de macrófago M1, como o TNF- α (PATSOIRIS et al., 2008; UYSAL et al., 1997; WEISBERG et al., 2006).

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; SALTIEL, 2007). Além disso, como mencionado anteriormente, a redução de peso vem sendo ligada com a polarização de macrófagos de M1 para M2, o que certamente contribui com a

melhor tanto no perfil inflamatório quanto na sensibilidade à insulina observada nesse contexto (HEVENER et al., 2007; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007).

Os macrófagos são o maior componente de defesa presente no fígado, mais especificamente nesse tecido os macrófagos residentes são denominados como células de Kupffer (CRISPE, 2009; KITA et al., 2001; SICA; MANTOVANI, 2012). Além de sua atividade de defesa, as células de Kupffer colaboram com a homeostasia do tecido, com especial destaque em sua participação nas funções de regulação metabólica (BISWAS; MANTOVANI, 2012; CRISPE, 2009; KITA et al., 2001; MANTOVANI et al., 2004, 2013; WICK et al., 2013; WYNN; BARRON, 2010). Nesse sentido, os macrófagos residentes possuem um papel significativo nas adaptações metabólicas dos hepatócitos durante períodos de grande ingestão calórica, favorecendo o acúmulo de gordura nas células desse tecido, resultando em doença hepática gordurosa não alcoólica, o que colabora de sobremaneira com o desenvolvimento de RI hepática (OLEFSKY; GLASS, 2010).

Ainda, assim como explicitado para o tecido adiposo, o fígado também parece apresentar acúmulo de células imunológicas, polarizadas no sentido M1, no decurso do desenvolvimento da obesidade e da RI associada, sugerindo assim uma função benéfica das células de Kupffer alternativamente ativadas na síndrome metabólica e na diabetes tipo 2 (ARKAN et al., 2005; LI; DIEHL, 2003; ODEGAARD et al., 2008; PAPACKOVA et al., 2012). Assim como o que ocorre com o tecido adiposo branco, no tecido hepático também podemos observar a formação de estruturas crown-like em volta dos hepatócitos em condições onde há condensação de lipídios, sendo que esses macrófagos são polarizados no sentido M1 (ITOH et al., 2013).

Uma das funções primordiais do fígado é regular as adaptações metabólicas em resposta aos diversos sinais provenientes da dieta; e nesse contexto as células de Kupffer M2 possuem papel essencial, pois regulam a oxidação de ácidos graxos (SICA et al., 2015). Fortalecendo ainda mais essa ideia, um estudo demonstrou que a ausência da ativação alternativa de macrófagos no fígado agravava a obesidade, a esteatose (acúmulo de gordura no fígado) e também a RI (KANG et al., 2008; ODEGAARD et al., 2008). Não obstante desses achados, a relação entre os macrófagos residentes do tecido hepático e suas implicações no metabolismo desse tecido esse ainda é um

campo pouco explorado se comparado aos avanços do conhecimento referentes à relação entre macrófagos, tecido adiposo e RI.

Paralelamente, evidências cada vez mais consistentes tornam claro que o exercício físico pode ser uma terapia útil no tratamento e também na profilaxia da RI, já que ele vem sendo associado à 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). Um dos pontos positivos do tratamento através da prática de exercícios físicos consiste em seu custo baixo associado ao fato de não promover importantes efeitos adversos como a maioria dos fármacos utilizados no tratamento de RI e diabetes tipo 2.

Foi evidenciado que o exercício agudo é eficiente na redução da atividade da proteína JNK, que ajuda a regular o processo de autodestruição celular, resultando na atenuação da inflamação crônica induzida pela obesidade (ROPELLE et al., 2006; SIVILOTTI; NISTRÌ, 1991). Em outro estudo mais recente, nosso grupo tem observado que a atividade física, com intensidade de leve a moderada, é capaz de reduzir a inflamação no fígado através da atenuação da via do toll-like receptor 4, o que, consequentemente, resultou em melhora na sensibilidade à insulina nesses animais (dados ainda não publicados).

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 (KAWANISHI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013). Por outro lado, ao contrário do que ocorre com o tecido adiposo branco, os possíveis efeitos anti-inflamatórios do exercício físico sobre os macrófagos do tecido hepático permanecem ainda não explorados. No presente estudo verificamos que o exercício físico é capaz de promover melhora na sensibilidade à insulina, entre outros aspectos, através da redução na infiltração e polarização M1 em tecido hepático de animais alimentador com dieta hiperlipídica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do treinamento de natação (8 semanas) na infiltração e no balanço da polarização de macrófagos no tecido hepático em ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica, através de estudos histológicos.

2.2 Objetivos específicos

Investigar o efeito do treinamento de natação no fígado na expressão de:

- F4/80 (infiltração);
- TNF- α (polarização M1);
- MGL1 (polarização M2).

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Anticorpos e Reagentes

Todos os anticorpos foram provenientes da Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA) ou Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Os reagentes de rotina do laboratório foram comprados da Sigma Chemical (St. Louis, MO).

3.2 Animais e dieta

Para os experimentos do presente trabalho foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Quando atingiram 6 semanas de idade os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: animais controle (CTL) alimentados com dieta padrão para roedores, animais alimentados com dieta hiperlipídica sedentários (DH), animais exercitados cronicamente (8 semanas) e alimentados com dieta hiperlipídica (DH+EC). Todos os animais receberam água e alimentação *libitum*.

3.3 Programa de treinamento físico crônico

O treinamento físico consistiu de natação dos animais em tanque específico (localizado no prédio da Biodinâmica do Instituto de Biociências do campus de Rio Claro) com água a 100 centímetros de profundidade, com temperatura de aproximadamente 34°C. Para adaptação ao exercício de natação, no primeiro dia os ratos foram inseridos ao meio líquido durante 5 minutos no tanque com água rasa (sem a necessidade de nadarem); no segundo dia, 5 minutos com água na altura da cabeça (os animais puderam nadar); no terceiro dia, 5 minutos com nível de água que exigiu que os animais nadassem; e no quarto dia eles nadaram por 15 minutos. Após esse período os animais do grupo DH+EC nadaram 60 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas, suportando uma carga que foi progressivamente aumentada de 2,5% a 5% do peso corporal, ajustada semanalmente, de acordo com o peso do animal na semana, como previamente descrito (MARTIN-CORDERO et al., 2009; SUGANAMI; OGAWA, 2010).

3.4 Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ITT)

O teste foi realizado ao término do protocolo de exercício físico. O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue equivaleu ao tempo 0 do teste. Após isso, a insulina (1,5U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitoneal e amostras de sangue coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica. A velocidade constante do decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. Calcula-se o $t_{1/2}$ da glicose a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

3.5 Verificação da glicemia e Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (GTT)

Depois de finalizado o protocolo experimental, os animais foram submetidos a um jejum de 6 horas e foi coletada uma amostra de sangue antes do desafio com glicose (tempo 0), em seguida uma solução de 20% de glicose (2.0g/kg peso corporal) foi administrada dentro da cavidade peritoneal. Para determinar a concentração da glicose do soro, amostras de sangue foram coletadas da cauda em 30, 60, 90 e 120 minutos e medida por um método colorimétrico utilizando-se um glicosímetro (Advantage. Boehringer Mannheim, USA).

3.6 Extração de Tecidos

Os animais foram anestesiados com Tiopental (40mg/kg) intraperitonealmente e utilizados após abolição do reflexo corneano e a retirada da pata à dor. A cavidade abdominal foi aberta e a veia porta exposta para injetar salina com ou sem insulina (10^{-6} .M). Transcorridos 30 segundos após o estímulo, foram retirados os fragmentos de fígado para serem utilizados em análise de RNA e também nos estudos histológicos.

3.7 Microscopia Óptica

Os tecidos foram extraídos e analisados ao microscópio óptico. Após dissecação, 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.

3.8 Imunoistoquímica

Para detectar os anticorpos de interesse, a fixação nas lâminas foi realizada em forno micro-ondas (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 incubados *overnight* a 4°C com o anticorpo primário de interesse (diluído 1:150). Os cortes incubados com o complexo avidina-biotina do Kit LSAB+ (Dako Cytomation) por 30 minutos seguidos pela coloração com a solução cromógena de tetracloreto de diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich). Após a contra coloração com hematoxilina as lâminas montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

3.9 Imunofluorescência

Para detectar os anticorpos de interesse, a fixação nas lâminas foi realizada em forno micro-ondas (Panasonic Junior) a 700W. As lâminas imersas em tampão citrato 0,01mol/L, pH 6,0 por 10 minutos e resfriadas à temperatura ambiente. Os cortes foram bloqueados em BSA e incubados *overnight* a 4°C com o anticorpo primário. A marcação com o anticorpo secundário foi realizada 55 utilizando-se o FITC-conjugatedda Santa Cruz Inc. (Santa Cruz, CA). Os cortes foram contramarcados com DAPI.

3.10 Análise dos resultados

Os dados estão expressos como médias $\pm$ desvio padrão, sendo indicado o número de experimentos independentes. Para análise estatística, os grupos serão comparados utilizando one-way ou two-way ANOVA com o teste Bonferroni conforme necessário. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Peso Corporal

Primeiramente avaliamos ao final do protocolo de experimento o peso corporal de todos os animais estudados. Os resultados mostraram que os animais alimentados com dieta hiperlipídica, sejam eles sedentários ou treinados, encontramos pesos significativamente superiores quando comparados aos apresentados pelos animais alimentados com dieta padrão para roedores (Fig. 1A). Ainda, quando comparamos somente os animais alimentados com dieta hiperlipídica foi visto que não houve diferença significativa entre o grupo DH e o grupo DH+EC (Fig. 1A). Esse resultado se mostra importante, pois tendo em vista que não houve redução significativa de peso entre os animais treinados comparados aos sedentários em dieta hiperlipídica, pode-se inferir que os efeitos observados no tecido hepático se deram, exclusivamente, em consequência do treinamento de natação, e não em virtude da redução do peso corporal.

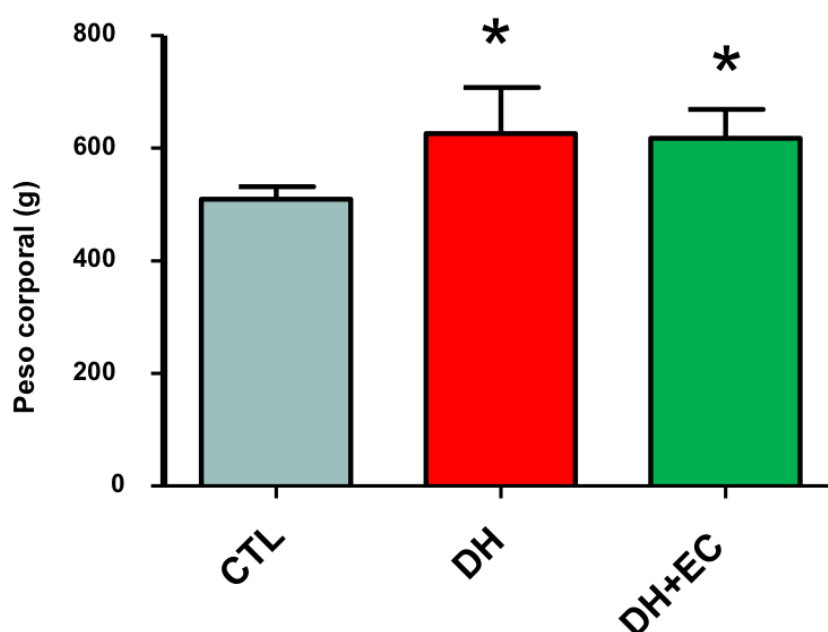


Figura 1 – Peso Corporal Final. (A) peso corporal ao final do protocolo experimental em animais CTL, DH e DH+EC. Os dados estão apresentados em Média ± EPM de 5 a 6 animais por grupo. *P < 0.05 vs. CTL.

4.2 Sensibilidade à insulina e à glicose

Após realizar a avaliação do peso corporal, seguimos a caracterização dos animais com a avaliação do efeito da dieta hiperlipídica e dos exercícios físico sobre a resistência à insulina. Para tanto, foram utilizados, dois testes, o ITT e o GTT que avaliam a tolerância à insulina e à glicose respectivamente.

Através do ITT foi possível observar que o grupo DH mostrou maior intolerância à insulina quando confrontado aos seus congêneres em dieta padrão para roedores, e que o exercício físico crônico teve a capacidade de reverter totalmente esse efeito negativo da dieta hiperlipídica como evidenciado pela comparação de suas áreas sob a curva (Fig. 2A). Em relação ao GTT, o mesmo padrão fora também apontado, inferindo que a dieta resultou em aumento na intolerância à glicose e em contrapartida o exercício físico foi capaz de minimizar tal efeito deletério (Fig. 2B).

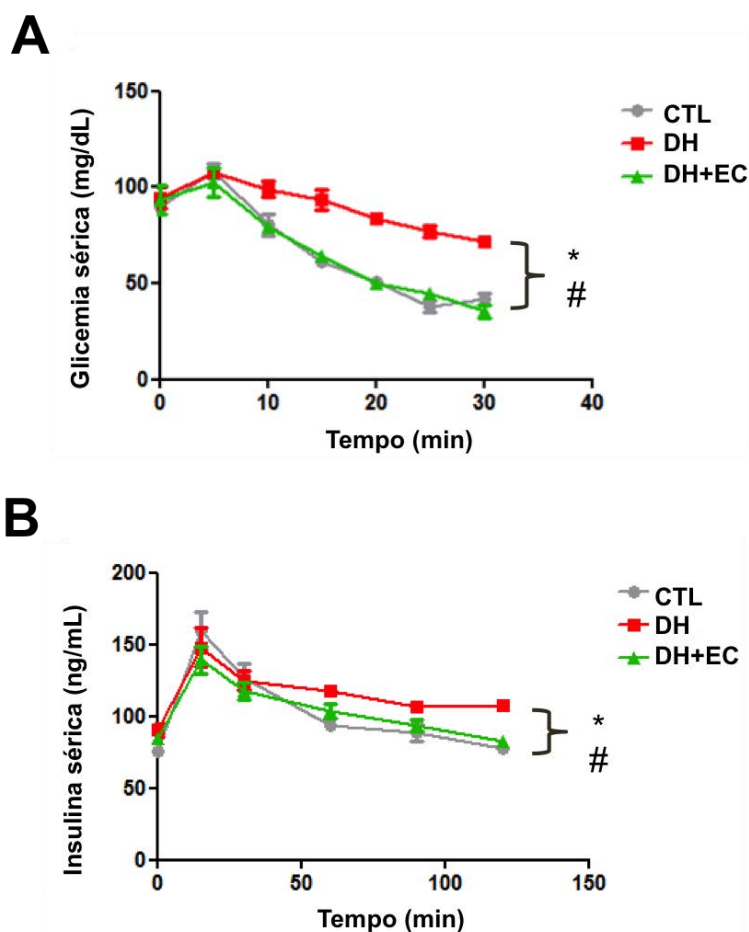


Figura 2 – Avaliação da sensibilidade à insulina. Teste de tolerância à insulina (A) e teste de tolerância à glicose (B) ao final do protocolo experimental em animais CTL, DH e

DH+EC. Os dados estão apresentados em Média $\pm$ EPM de 5 a 6 animais por grupo. * $P < 0.05$ vs. CTL e # $P < 0.05$ vs. DH.

4.3 Caracterização da infiltração de Macrófagos M1

Uma vez verificado que o protocolo de exercício físico aplicado aos animais melhorou a sensibilidade à insulina, como evidenciado pelo ITT e GTT, decidiu-se avaliar, primeiramente, a infiltração e posteriormente a polarização M1 de macrófagos no tecido hepático de todos os grupos utilizados nesse estudo. Para tal avaliação utilizamos a técnica de Imunofluorescência na qual o DAPI (em azul) é o marcador de núcleo celular, o F4/80 (em vermelho) o pan marcador para macrófago e o TNF- α (em verde) para marcar os macrófagos M1.

Os resultados revelaram que a dieta resultou em um grande aumento de marcação F4/80, ou seja, de macrófagos no tecido hepático devido à alimentação rica em lipídios, e que o exercício físico crônico reduziu de forma significativa o conteúdo de macrófagos desse tecido (Fig. 3). Já quando avaliamos a marcação de TNF- α em conjunto com o F4/80, verificamos a presença de mais macrófagos M1 nos animais do grupo DH e uma redução significativa dessa citocina inflamatória nos animais treinados (Fig. 3).

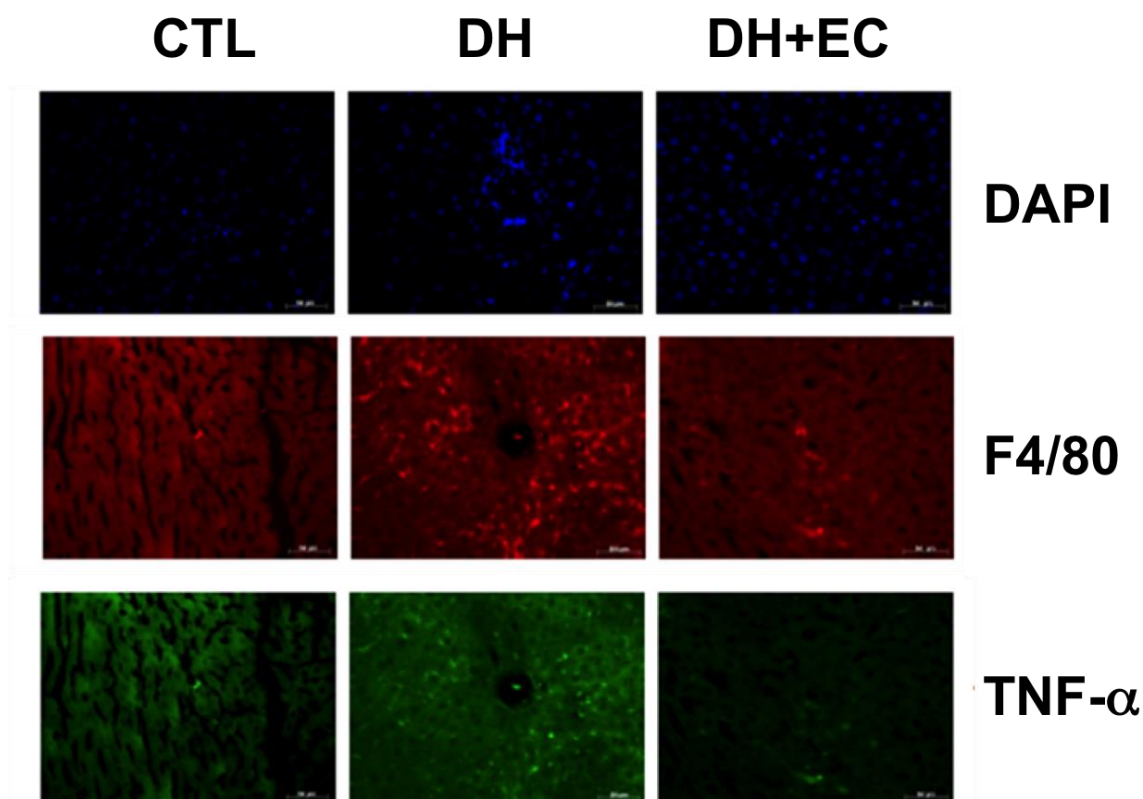


Figura 3 – Caracterização da infiltração de macrófagos e da polarização M1. Microfotografias representativas de marcação F4/80 (vermelho) e TNF- α (verde) em tecido hepático dos grupos CTL, DH e DH+EC ao final do protocolo experimental. O n experimental é de 3 animais por grupo.

4.4 Polarização M2 de Macrófagos

Em seguida avaliamos a polarização M2 no fígado através da técnica de imunoistoquímica utilizando como marcador o anticorpo MGL1, como utilizado previamente (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007). Os resultados evidenciaram que os animais do grupo controle apresentam considerável marcação desse tipo de macrófago (Figura 4). Já nos animais alimentados com dieta hiperlipídica que permaneceram sedentários, essa marcação praticamente desapareceu. (Figura 4).

Quando foram avaliados os animais alimentados com a dieta hiperlipídica que foram submetidos ao treinamento de natação, observou-se que houve um aumento na marcação de MGL1, ou seja, houve melhora na polarização M2 (Figura 4).

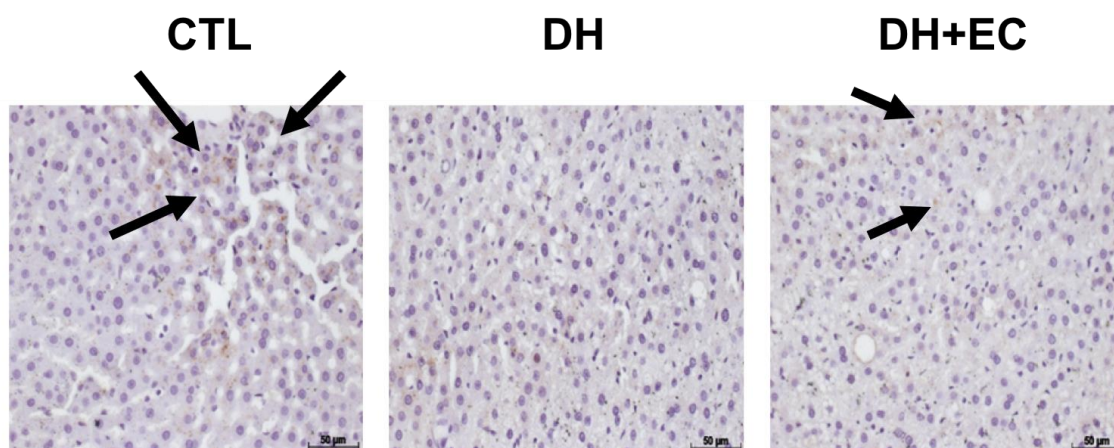


Figura 4 – Efeito do Treinamento na Polarização de macrófagos M2. Microfotografias representativas de marcação MGL-1 em fígado de animais dos grupos CTL, DH e DH+EC ao final do protocolo experimental. O n experimental é de 3 animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

É de conhecimento geral que uma dieta hiperlipídica aumenta facilmente o peso corporal, seja no homem ou em animais, podendo causar a obesidade, reconhecida como um problema sério de saúde. Também é sabido que a atividade física de intensidade moderada é capaz de acrescentar o gasto calórico e assim tratar a obesidade (KAWANISHI et al., 2012; OKAY et al., 2009; SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007).

Dando suporte a tal conceito, estudos prévios demonstraram que uma modesta redução de peso decorrente de dietas restritivas ou incrementos de exercício físico pode melhorar a sensibilidade à insulina ou ainda reverter quadros de RI, e possivelmente melhorar o perfil inflamatório (TOLEDO et al., 2008; TURNER et al., 2007). Contudo, neste projeto, a ausência de diferença significativa no peso entre os animais treinados e sedentários alimentados com dieta hiperlipídica pode se dar pelo baixo n experimental aqui reportado, sendo assim, é sugestivo a realização de um novo ensaio com maior número de animais envolvidos, dada a importância e aplicabilidade deste projeto.

A obesidade está intimamente ligada a um estado inflamatório crônico de baixo grau geral caracterizado por ativação de macrófagos e produção de citocinas inflamatórias, levando à resistência à insulina (RI). Não obstante, se tomados em seu conjunto, os resultados de ITT e GTT sugerem que o treinamento de natação promoveu melhora na resistência à insulina. Resultado esse que está em total consonância com a literatura, visto que tem sido uniformemente observado que a atividade física praticada de forma crônica e também uma sessão aguda podem melhorar tanto a via de sinalização quanto a sensibilidade à insulina em animal e humano (KASAPIS; THOMPSON, 2005; OLIVEIRA et al., 2013; PAULI et al., 2008; ROPELLE et al., 2006, 2010).

O desenvolvimento progressivo da RI associado a processos inflamatórios crônicos vem sendo cada vez mais apontado; é um estado pré-diabético que atualmente confere uma anormalidade metabólica generalizada em adultos e adolescentes (FUENTES; ROSZER; RICOTE, 2010). Frente aos resultados apresentados e aos estudos já publicados, é possível afirmar que o exercício físico é de suma importância e que sua prática deve ser exercida não

somente por indivíduos obesos, mas também pelos não-obesos para manutenção da saúde e qualidade de vida.

Os macrófagos vêm sendo reconhecidos como as principais fontes de mediadores pró-inflamatórios, que são em grande parte responsáveis pela manifestação de RI. Os macrófagos M1 expressam poderosamente o TLR4, que quando ativado leva a potente expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Em contraste, os macrófagos M2 geram IL-10, o que suprime os estados pró-inflamatórios (DAVIS et al., 2013; WANG; LIANG; ZEN, 2014). Os resultados obtidos para o grupo DH não são novos visto que estudos anteriores já haviam demonstrado o aumento no conteúdo de macrófagos no fígado em decorrência da dieta hiperlipídica (KAWANISHI et al., 2012, 2013; ODEGAARD et al., 2008).

Em relação à redução na polarização M1 resultante do exercício crônico de natação pode-se levantar a teoria de que tal alteração pode ter papel no efeito de melhora na sensibilidade à insulina nos animais treinados. Contribuindo com essa conjectura, estudos anteriores indicam que a redução na quantidade de macrófagos M1 em fígado e tecido adiposo branco resulta em melhora na sensibilidade à insulina (KANG et al., 2008; ODEGAARD et al., 2008). Além disso, animais obesos submetidos ao exercício crônico ou agudo mostraram importante redução na quantidade de macrófago M1 em tecido adiposo branco (KAWANISHI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013). Assim, estudos subsequentes que possam associar a redução na polarização M1 com menores níveis de citocinas inflamatórias no fígado em consequência do treinamento certamente será importante para confirmar tais conjecturas.

Atenuar a inflamação no tecido hepático é uma modificação importante por exemplo para o tratamento da esteatose hepática. Na obesidade, as citocinas inflamatórias liberadas do tecido adiposo se movem para o fígado através do portal e interferem diretamente nas funções hepáticas. Especialmente as células de Kupffer são fontes importantes de citocinas inflamatórias no fígado e são os macrófagos habitantes desse tecido. Durante a esteatose, o recrutamento destes no fígado pode alterar a distribuição celular, alterando também a morfologia e a função das células de Kupffer (BILZER; ROGGER; GERBES, 2006; JEONG et al., 2015).

Mais especificamente, um relevante mecanismo no fígado, que acarreta no acúmulo de gordura no mesmo, parece ser a secreção de citocinas inflamatórias, que possuem como fonte principal os macrófagos M1 (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008). Nessa linha, estudos prévios mostraram que o exercício moderado foi eficiente para redução do conteúdo lipídico e a inflamação no tecido hepático em roedores alimentados com dieta hiperlipídica ou rica em frutose (BOTEZELLI et al., 2016; LINDEN et al., 2016).

Assim, podemos levantar a hipótese de que a redução de macrófagos M1 no tecido hepático é capaz de colaborar com a melhora da inflamação, da sinalização à insulina e do acúmulo de gordura normalmente induzidos pelo exercício físico crônico.

Dois outros estudos mostraram que o treinamento de exercícios reduz as citocinas inflamatórias no tecido adiposo e marcadores de macrófagos M1, suprimindo vários genes de diferenciação de adipócitos (JEONG et al., 2015; KAWANISHI et al., 2012), o que contribui para corroborar os dados do presente estudo e incentivar futuras pesquisas na área com maior número amostral.

Os resultados de estudos a respeito da melhora na polarização M2 corroboram com os resultados observados no ITT e GTT, uma vez que a polarização de macrófagos M2 possui relação positiva com a melhora na sensibilidade à insulina. Estudos anteriores mostraram de forma consistente tal associação (GLEESON et al., 2011; LUMENG et al., 2008; LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007; OLIVEIRA et al., 2013). Ainda, como supramencionado, a esteatose parece ter grande relação com o processo inflamatório que se desenvolve no tecido hepático durante o decurso da obesidade, o que sugere um possível efeito benéfico dos macrófagos M2 nesse contexto (OLEFSKY; GLASS, 2010).

Assim, a polarização no sentido M2 obtida com o treinamento pode ter um papel relevante na esteatose. Quando tomamos em conjunto os dados de infiltração e polarização podemos inferir que o exercício físico crônico melhorou de forma significativa o perfil inflamatório do tecido hepático de animais alimentados com dieta hiperlipídica.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo nos permitem corroborar a capacidade de indução à polarização dos macrófagos de M1 para M2, através do exercício físico crônico em animais alimentados com dieta hiperlipídica. E também afirmar que esse fenômeno, o exercício físico crônico, colabora com o efeito anti-inflamatório e de melhora na resistência à insulina. Ainda assim, percebe-se que serão necessários mais estudos, com um maior n experimental para confirmar o efeito benéfico do exercício físico acerca da ingestão de uma dieta rica em lipídeos.

7. REFERÊNCIAS

ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 12, p. 975–987, 2007.

ARKAN, M. C. et al. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 191–198, 2005.

BILZER, M.; ROGGEL, F.; GERBES, A. L. **Role of Kupffer cells in host defense and liver disease***Liver International*, 2006.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. **Tumor-associated macrophages: Functional diversity, clinical significance, and open questions***Seminars in Immunopathology*, 2013.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Orchestration of Metabolism by Macrophages. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 432–437, 4 abr. 2012.

BOTEZELLI, J. D. et al. Strength Training Prevents Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, and Inflammation Independent of Weight Loss in Fructose-Fed Animals. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

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. 586–594, 2008.

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 622. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 0193–1849 (Print), p. E961–E967, 2006.

CAILHIER, J. F. et al. Conditional Macrophage Ablation Demonstrates That Resident Macrophages Initiate Acute Peritoneal Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 4, p. 2336–2342, 2005.

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. 2277–2286, 2005.

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. 1554–1561, 2006.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 11, p. 2347–2355, 2005.

CRISPE, I. N. The Liver as a Lymphoid Organ. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 147–163, abr. 2009.

DAVIS, M. J. et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. **mBio**, v. 4, n. 3, 2013.

DÖRGER, M. et al. Phenotypic and functional differences between rat alveolar, pleural, and peritoneal macrophages. **Experimental lung research**, v. 27, n. 1, p. 65–76, [s.d.].

FUENTES, L.; ROSZER, T.; RICOTE, M. **Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: Role of nuclear receptor signaling in macrophages** *Mediators of Inflammation*, 2010.

GLEESON, M. et al. **The anti-inflammatory effects of exercise: Mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease** *Nature Reviews Immunology*, 2011.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23–35, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. [Nat Rev Immunol. 2005] - PubMed result. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953–64, 2005.

GRANT, R. W.; DIXIT, V. D. Adipose tissue as an immunological organ. **Obesity**, v. 23, n. 3, p. 512–518, 2015.

GREIWE, J. S. et al. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor

necrosis factor alpha in frail elderly humans. **FASEB Journal**, v. 15, n. 2, p. 475–482, 2001.

HELD, T. K. et al. Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 206–212, 1999.

HEVENER, A. L. et al. Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 6, p. 1658–69, 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S. **Inflammation and metabolic disorders** *Nature*, 2006.

ITOH, M. et al. Hepatic crown-like structure: A unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

JEONG, J. H. et al. The effects of either resveratrol or exercise on macrophage infiltration and switching from M1 to M2 in high fat diet mice. **Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 65–72, 2015.

KAHN, B.; FLIER, J. Obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 473–481, 2000.

KANG, K. et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. **Cell metabolism**, v. 7, n. 6, p. 485–95, 2008.

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. 1563–1569, 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. **Exercise Immunology Review**, v. 16, p. 105–118, 2010.

KAWANISHI, N. et al. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 26, n. 6, p. 931–41, ago. 2012.

KAWANISHI, N. et al. Exercise training attenuates adipose tissue fibrosis in diet-induced obese mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 4, p. 774–779, 2013.

KITA, H. et al. The lymphoid liver: Considerations on pathways to autoimmune injury. **Gastroenterology**, v. 120, n. 6, p. 1485–1501, 2001.

KOMOHARA, Y. et al. Contribution of Macrophage Polarization to Metabolic Diseases. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 23, n. 1, p. 10–17, 2016.

LI, Z.; DIEHL, A. M. Innate immunity in the liver. **Current opinion in gastroenterology**, v. 19, n. 6, p. 565–71, nov. 2003.

LINDEN, M. A. et al. Aerobic exercise training in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease related fibrosis. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 18, p. 5271–5284, 2016.

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. 3239–3246, 2008.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MANTOVANI, A. et al. **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization** *Trends in Immunology*, 2004.

MANTOVANI, A. et al. **Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling** *Journal of Pathology*, 2013.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. **Macrophage polarization comes of age** *Immunity*, 2005.

MARTIN-CORDERO, L. et al. Influence of exercise on the circulating levels and macrophage production of IL-1 β and IFN γ affected by metabolic syndrome: an obese Zucker rat experimental animal model. **European journal of applied physiology**, v. 107, n. 5, p. 535–543, 2009.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. [Front Biosci. 2008] - PubMed result. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 453–61, 2008.

MURRAY, P. J. et al. **Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines** Immunity, 2014.

NAITO, M. et al. Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 59, n. 2, p. 133–138, 1996.

NOVAK, M. L.; KOH, T. J. **Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair** American Journal of Pathology, 2013.

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

ODEGAARD, J. I. et al. Alternative M2 Activation of Kupffer Cells by PPAR δ Ameliorates Obesity-Induced Insulin Resistance. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 6, p. 496–507, 2008.

OKAY, D. M. et al. **Exercise and Obesity** Primary Care - Clinics in Office Practice, 2009.

OLEFSKY, J.; GLASS, C. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. **Annu Rev Physiol.**, v. 72, p. 219–46, 2010.

OLIVEIRA, A. G. et al. Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats. **Obesity**, v. 21, n. 12, p. 2545–2556, 2013.

PAPACKOVA, Z. et al. Kupffer cells ameliorate hepatic insulin resistance

induced by high-fat diet rich in monounsaturated fatty acids: the evidence for the involvement of alternatively activated macrophages. **Nutr Metab (Lond)**, v. 9, p. 22, 2012.

PATSOURIS, D. et al. Ablation of CD11c-Positive Cells Normalizes Insulin Sensitivity in Obese Insulin Resistant Animals. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 4, p. 301–309, 2008.

PAULI, J. R. et al. Acute physical exercise reverses S -nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 2, p. 659–671, 15 jan. 2008.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 4, p. 1154–1162, 2005.

PHIPPS, K. D. et al. Alternatively activated M2 macrophages improve autologous fat graft survival in a mouse model through induction of angiogenesis. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 135, n. 1, p. 140–149, 2015.

PICKUP, J. C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 27, n. 3, p. 813–23, 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. 1241–1248, 1998.

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. **The Journal of physiology**, v. 577, n. Pt 3, p. 997–1007, 15 dez. 2006.

ROPELLE, E. R. et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. **PLoS Biology**, v. 8, n. 8, p. 31–32, 2010.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: Modulation by nutrients and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 9, p.

2992–3002, 2008.

SCHULZ, C. et al. A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6077, p. 86–90, 2012.

SHAUL, M. E. et al. Dynamic, M2-like remodeling phenotypes of CD11c+ adipose tissue macrophages during high-fat diet - Induced obesity in mice. **Diabetes**, v. 59, n. 5, p. 1171–1181, 2010.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169–2180, 2007.

SICA, A. et al. **Macrophage polarization in pathology** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015.

SICA, A.; MANTOVANI, A. **Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas** *Journal of Clinical Investigation*, 2012.

SIVILOTTI, L.; NISTRI, A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 36, n. 1, p. 35–92, jan. 1991.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 1, p. 33–9, 2010.

TOLEDO, F. G. S. et al. Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 987–994, 2008.

TOSELLO-TRAMPONT, A. C. et al. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40161–40172, 2012.

TURNER, N. et al. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: Evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 2085–2092, 2007.

UYSAL, K. T. et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 610–4, 1997.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. **Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance** *Frontiers in Immunology*, 2014.

WEISBERG, S. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WEISBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 115–124, 2006.

WICK, G. et al. The Immunology of Fibrosis ECM: extracellular matrix. **Annu. Rev. Immunol**, v. 31, p. 107–35, 2013.

WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. et al. Colony-stimulating factor 1-dependent resident macrophages play a regulatory role in fighting *Escherichia coli* fecal peritonitis. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 5, p. 1577–1581, 1996.

WYNN, T. A.; BARRON, L. **Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis** *Seminars in Liver Disease*, 2010.

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. 1821–30, 2003.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 941–946, 2001.

8. 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.

RNA_m - RNA mensageiro.

TAB - Tecido Adiposo Branco.

TAM - Tecida Adiposo Marrom.

TNF- - Fator necrose tumoral.

DISCENTE**ORIENTADOR**

Igor Alexandre Domingues

Prof. Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira